



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme MARIELLE PAGES

le jeudi 12 novembre 2015

Titre :

EFFETS ET MECANISMES D'ACTION DE L'OZONE UTILISE COMME
MOYEN DE LUTTE CONTRE DES CHAMPIGNONS PATHOGENES DU
POMMIER: ETUDES IN VITRO ET IN VIVO

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Département Sciences Agronomiques et Agroalimentaires (SSA-EIP)

Directeur(s) de Thèse :

M. FRÉDÉRIC VIOLLEAU

M. DIDIER KLEIBER

Rapporteurs :

M. MARC AUROUSSEAU, INP DE GRENOBLE

M. MARC BARDIN, INRA AVIGNON

Membre(s) du jury :

M. GILLES HEBRARD, INSA TOULOUSE, Président

M. FRÉDÉRIC VIOLLEAU, EI PURPAN, Membre

Mme MARIE-HÉLÈNE MANERO, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

Mme VALERIE CAFFIER, INRA ANGERS, Membre

Remerciements

Ce n'est jamais évident en quelques lignes de trouver les mots justes pour remercier toutes les personnes qui ont œuvrées au bon déroulement d'un travail de trois ans. Voici donc une liste non-exhaustive...

Je tiens tout d'abord à remercier Frédéric Violleau et Didier Kleiber pour m'avoir encadré durant cette thèse. Je les remercie sincèrement pour leur soutien sans faille. Je tiens à souligner leur disponibilité mais également leur attention à mon égard, s'assurant toujours que je résistais face aux difficultés. J'ai également beaucoup apprécié nos échanges réguliers, passionnants, très riches en idées et fructueux en expériences. Merci enfin pour votre soutien (et votre patience) pendant la phase de rédaction. Tout est bien qui finit bien ... et dans les temps !

Je tiens également à remercier Marc Aurousseau et Marc Bardin d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse en qualité de rapporteurs, ainsi que Gilles Hébrard, Marie-Hélène Manero, Valérie Caffier et Séverine Maldès pour avoir accepté de participer à mon jury.

Je remercie également tout le personnel de l'école, du laboratoire et tout particulièrement Mireille Gaucher-Delmas, la « maman » du labo, ainsi que Christel Couderc, pour leurs oreilles attentives et leurs précieux conseils. Bien évidemment ma thèse n'aurait pas été la même sans Romain et Claire (les « vieux thésards » qui ont montrés le chemin), Eugénie et Sophie (mes « contemporaines » avec qui nous avons tant de choses en commun), Hélène et Simon-Félix-Guillaume (les jeunots venus apportés du renouveau !). Merci pour tous les moments de partage, de réconfort et d'amitié que nous avons passés ensemble, de la petite pause café du matin aux soirées, week-end et autres congrès ! Merci également à Micka pour le soutien et l'écoute (et aussi un peu pour les blagues) : à quand une thèse sur les thésards ? (J'ai déjà trouvé le titre : « Comportement des thésards au fil de leur thèse »). Je n'oublie pas non plus les nombreuses stagiaires (Solène, Camille, Paloma, Morgane, Charlotte, Camille) et collègues nouvellement diplômées (Marine et Valérie) qui ont travaillé sur le projet ! Merci pour votre sens du travail en équipe et votre implication...

Mes remerciements seraient incomplets si je ne citais pas mes amis de toujours, qui ne sont pas du monde de la recherche et qui m'ont permis de m'évader de l'ozone, des pommes et autres champignons l'espace de nos nombreuses soirées et vacances ! C'était un vrai bol d'air pur... moins ozoné... et tellement important !

Bien sûr, je n'en serai pas arrivé là sans mes parents et mon frère. Vous avez cru en moi dès le début et vous avez été une force pendant toute ma vie... Et vous le resterez !

Guilhem et Cassandre sont également de vrais petits soleils qui vous rappellent aussi que la vie passe vite... qu'il faut en profiter et relativiser !

The last but not the least : merci à toi, Yohann. Merci pour... tout. Pour les heures d'écoute, de soutien, de réconfort, d'aide et de fous-rires... Toi aussi, tu as toujours cru en moi, en nous. Comme disait mon papi, quand on se marie, il faut planter un champ de patience pour tenir toute une vie... J'espère que je n'en ai pas trop utilisé en trois ans de thèse et qu'il t'en restera pour de nombreuses années encore !

Enfin, je conclurai en disant que la thèse aura été pour moi une formation certes technique et scientifique mais surtout une formidable aventure humaine.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	7
Résumé	13
Abstract	14
Liste des abréviations	17
Introduction	19
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	27
I- Les maladies fongiques du pommier, cibles de l'étude	29
A- La tavelure : maladie causée par <i>V.inaequalis</i>	29
1) Description de la maladie	30
2) Moyens de lutte actuels	31
B- Les maladies de conservation	37
1) Description	38
a- La pourriture grise : <i>Botrytis cinerea</i>	38
b- Les gloeosporioses : <i>Neofabraea alba</i>	39
c- <i>Phytophthora</i> spp	41
2) Moyens de lutte utilisés en pré-récolte ou avant stockage	42
II- L'ozone : un agent antifongique	45
A- Modes de génération de l'ozone et de l'eau chargée en ozone	46
1) Production de l'ozone	46
a- Par décharge Corona	46
b- Par radiation UV	47
c- Par voie électrochimique	47
2) Ozonation de l'eau	48
B- Propriétés physico-chimiques de l'ozone	50
1) Sa structure moléculaire	50
2) Sa réactivité	51
3) Sa solubilité et sa stabilité	53
C- Propriétés antifongiques de l'ozone	56
1) Application de l'ozone <i>in vitro</i>	56
a- Effet antifongique de l'ozone	56
i. Effet de l'application d'ozone gazeux	57
ii. Effet de l'application d'eau chargée en ozone	61
b- Mécanismes d'action sur les organismes biologiques	62
2) Applications de l'ozone <i>in vivo</i>	66
a- Traitement à l'ozone en pré-récolte	66

Table des Matières

b-	Traitement à l'ozone en post-récolte	68
i.	Impact de la matrice et du milieu à traiter	69
ii.	Traitements sur pommes	69
III-	L'ozone, un agent anti-fongique contre les principaux pathogènes du pommier ?	72
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes		75
I-	Obtention de suspensions de spores fongiques	77
A-	<i>Venturia inaequalis</i>	77
B-	<i>Botrytis cinerea</i>	77
C-	<i>Neofabraea alba</i>	78
D-	<i>Phytophthora syringae</i>	79
II-	Evaluation de l'action de l'ozone sur spores <i>in vitro</i>	79
A-	Mise en œuvre de l'ozonation de suspensions de spores	79
1)	Application de l'ozone	80
a-	Procédé de traitement utilisé	80
b-	Concentrations en ozone et durées d'application	81
i.	Cas du bullage de l'ozone directement dans la suspension de spores	81
ii.	Cas de l'addition d'eau chargée en ozone sur suspensions de spores	82
2)	Mesure du taux de germination	83
i.	Suivi sur cellules de Malassez	83
ii.	Suivi sur milieu gélosé	85
B-	Evaluation de la dégradation de la membrane cellulaire des spores fongiques sous l'effet de l'ozone	85
1)	Mesure du degré de peroxydation des phospholipides	85
a-	Principe	85
b-	Mise en œuvre	86
2)	Identification des modifications cellulaires par Microscopie Optique	87
a-	Après coloration au bleu de Méthylène	88
b-	Après coloration au bleu de Trypan	88
3)	Observation de la topographie de surface par Microscopie Electronique à Balayage	88
C-	Action de l'ozone sur spores en cours de développement	89
1)	Principe et objectifs	89
2)	Mise en œuvre	90
III-	Etude de l'action de l'eau chargée en ozone sur des plants contaminés : modèle <i>in vivo</i>	92
A-	Principe	92
B-	Mise en œuvre	92
1)	Obtention des plants	92
2)	Inoculation	93
3)	Traitement à l'eau chargée en ozone	94
4)	Evaluation des performances du traitement par le degré de sévérité de la maladie	96
IV-	Traitement des données	96
Chapitre 3 : Résultats		99
I-	Action de l'ozone sur spores <i>in vitro</i>	101

Table des Matières

A-	Evaluation de la viabilité des spores sous l'effet de l'ozone	101
1)	Apport d'ozone par bullage dans des suspensions de spores	101
a-	Evaluation de l'effet anti-germinatif	101
b-	Evaluation des effets des conditions d'ozonation	105
c-	Confirmation du caractère létal de l'ozone	110
2)	Apport d'eau chargée en ozone sur suspensions de spores	112
a-	Effet anti-germinatif	112
b-	Caractère létal de l'ozone	115
3)	Conclusions	116
II-	Action de l'ozone sur la membrane cellulaire des spores fongiques	117
A-	Mesure du degré de peroxydation des phospholipides membranaires	117
B-	Evaluation de la fonctionnalité cellulaire	121
1)	Intégrité cellulaire	121
2)	Mise en évidence de la perte de fonctionnalité de la spore	122
3)	Mise en évidence de la désorganisation cellulaire	123
C-	Confirmation de la modification structurale de la membrane cellulaire	125
D-	Conclusions	130
III-	Action de l'ozone sur spores en développement	131
A-	Sensibilité à l'ozone selon le stade de développement	131
B-	Validation du stade de développement optimal d'application de l'ozone	134
C-	Conclusions	135
IV-	Action de l'ozone <i>in vivo</i>	137
A-	Validation de l'effet anti-fongique de l'ozone contre les conidies de <i>V.inaequalis</i> sur jeunes plants	138
B-	Confirmation de l'effet anti-fongique de l'ozone à quantité d'eau comparable	142
C-	Effet de l'application renforcée d'ozone	147
D-	Conclusions	150
1)	Effet avéré d'un traitement à l'eau ozonée	150
2)	Influence de la quantité d'eau et de la durée d'humectation	150
	Chapitre 4 : Conclusions et perspectives	153
I-	Confirmation de l'effet anti-fongique de l'ozone sur les spores de champignons pathogènes du pommier	155
A-	Effet anti-fongique de l'ozone sur les spores fongiques	155
B-	Différence de sensibilité entre espèces	156
C-	Effet anti-fongique de l'eau chargée en ozone sur spores en cours de développement	158
D-	Perspectives	159
II-	Implication de l'altération de la membrane dans l'inactivation des spores par l'ozone	160
A-	Peroxydation des phospholipides et perméabilité de la surface cellulaire	160
B-	Proposition du mécanisme d'action de l'ozone sur les spores fongiques	161
C-	Perspectives	163
III-	Limitation du développement fongique par l'application d'eau chargée en ozone en conditions contrôlées en vue du transfert en verger	163
A-	Influence des quantités d'eau et d'ozone	163
B-	Phénomène de désorption	164

Table des Matières

C- Perspectives	167
Conclusion générale	171
Bibliographie	177
Liste des illustrations	187
I- Liste des tableaux	187
II- Liste des figures	188
Productions scientifiques	193

Résumé

Les pommiers sont la cible de nombreux ravageurs et maladies fongiques, à l'origine de pertes économiques importantes. Les agriculteurs sont dans l'obligation de traiter les micro-organismes responsables des maladies fongiques, notamment à l'aide de pesticides. Les produits phytosanitaires sont aujourd'hui très controversés. Ainsi, les pouvoirs publics, français et européens, contrôlent leur emploi par de nombreuses réglementations. Par conséquent, il apparaît nécessaire de proposer une alternative peu rémanente permettant de contrôler le développement fongique.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'efficacité d'une alternative innovante basée sur l'emploi d'eau chargée en ozone contre quatre espèces fongiques à l'origine des principales maladies du pommier : *Venturia inaequalis*, *Botrytis cinerea*, *Neofabraea alba* et *Phytophthora syringae*.

Dans un premier temps, ce travail de thèse a permis de vérifier l'action anti-fongique de l'ozone sur les suspensions de spores des quatre espèces fongiques ainsi que sur différents stades de développement des spores de *V. inaequalis*. Il a été mis en évidence une différence de sensibilité selon l'espèce et le stade de développement considérés. Par ailleurs, l'altération de la membrane sous l'action de l'ozone a été observée par plusieurs expérimentations : quantification du degré de peroxydation des phospholipides membranaires, observations des spores au Microscope Electronique à Balayage et au Microscope Optique après colorations.

Dans un second temps, l'effet de l'eau chargée en ozone a été évalué sur des jeunes plants de pommiers préalablement contaminés par les spores de *V. inaequalis*. Cette étude a confirmé l'action anti-fongique de l'eau chargée en ozone. Il a également été observé l'importance des quantités d'eau et d'ozone apportées qui doivent être maîtrisées pour optimiser l'efficacité du traitement. Ces résultats permettent de valider la candidature de l'ozone comme fongicide alternatif à l'emploi de produits phytosanitaires. Les modalités d'application devront faire l'objet de recherches supplémentaires en vue du transfert de la technologie du laboratoire au verger.

MOTS CLES : Eau chargée en ozone, spores fongiques, oxydation, pommier.

Abstract

Apple trees are the target of a lot of pests and fungal diseases, responsible for many economic losses. Farmers treat these micro-organisms mainly with pesticides. Plant-protection products are today very controversial. French and European authorities control their use by means of numerous regulations. Therefore, an alternative solution with a low remanence must be found in order to limit fungal diseases.

The aim of this thesis is to evaluate the innovative process efficiency based on the use of ozonated water against four fungal species: *Venturia inaequalis*, *Botrytis cinerea*, *Neofabraea alba* and *Phytophthora syringae*.

Firstly, this work of thesis verified the ozone antifungal action on spores suspensions of the four fungal species and on different stages of development of *V. inaequalis* spores. According to the species and stages of development considered, a difference of sensibility was detected. Moreover, alteration of the membrane, due to ozone action, was observed thanks to several experimentations: quantification of phospholipids peroxidation, spore observations with Scanning Electron Microscopy and with Optical Microscopy after staining.

Secondly, the ozonated water effects on seedlings previously contaminated by *V. inaequalis* spores were evaluated. This study confirmed the anti-fungal action of water containing ozone. It was also observed the importance of the water and of ozone quantities supplied. These quantities must be controlled to optimize the antifungal action of the treatment. These results validated the ozone application as a fungicide alternative of use of pesticides. Additional researches will be made concerning the treatment modalities: the aim is to transfer the technology from the laboratory to the orchard.

KEY WORDS: ozonated water, fungal spores, oxidation, apple trees.

Liste des abréviations

1-MCP : 1-MethyCycloPropene

BSA : Albumine bovine

CO : Concentration en Ozone

D : Durée de bullage

DO : Dose d'ozone

GPI : GlycolPhosphatidylInositol

GRAS : Generally Recognized As Safe

LMR : Limite Maximale de Résidus

MDA : MalonDiAldéhydes

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MEA : Malt Extract Agar

MET : Microscope Electronique à Transmission

NF : Norme Française

PDA : Patato Dextrose Agar

POA : Procédés d'Oxydation Avancée

ROS : Reactive Oxygen Species

UV : Ultra-Violet

Introduction

La pomme est le fruit préféré des français qui en consomment en moyenne 20 kg/an/ménage. Avec 1,6 millions de tonnes de fruits produits chaque année, la France est le troisième producteur européen. Trois grands bassins de production sont impliqués dans cette filière : la Vallée de la Loire, la Vallée de la Garonne et le Sud-Est (Poullette, 2015).

La production française doit néanmoins aujourd'hui faire face à des concurrents de plus en plus présents sur le marché (comme l'Italie ou la Pologne) ainsi qu'à des consommateurs de plus en plus exigeants. Ces derniers souhaitent notamment des fruits sans défaut et savoureux. Les acteurs de la filière pomme ont donc concentré leurs efforts durant ces dernières décennies sur l'amélioration des caractéristiques physiologiques, organoleptiques et cosmétiques du fruit. La qualité sanitaire est également au cœur des préoccupations. Les pommes sont en effet la cible de nombreux ravageurs et maladies générant d'importantes pertes économiques en l'absence de moyens de contrôle. Les agriculteurs se voient donc dans l'obligation de protéger les pommiers et les pommes, notamment à l'aide de produits phytosanitaires. L'emploi des pesticides est aujourd'hui controversé et est fortement réglementé. La directive européenne 76/895/EEC fixant les Limites Maximales de Résidus (LMR) en est un exemple. Cette exigence sanitaire s'intensifie : la Grande-Bretagne et la Nouvelle Zélande recherchent des pommes sans aucun résidu tandis que l'Allemagne n'autorise plus que quatre résidus différents sur un même fruit.

La France n'échappe pas à cette dynamique. Ainsi, le plan Ecophyto 2018, lancé suite au Grenelle de l'environnement de 2008, a pour objectif de réduire l'utilisation des produits phytosanitaires tout en gardant un système agricole économiquement efficace : la qualité et les quantités produites doivent rester constantes.

C'est dans ce contexte qu'est né le projet INNO'POM dans lequel s'inscrit la présente thèse. Ce projet a pour but de produire une pomme de haute qualité, sans résidu, en limitant l'utilisation des produits phytosanitaires tout au long de la filière, du verger jusqu'au conditionnement. L'objectif est de « développer de nouveaux produits et procédés pour proposer une offre de pomme de qualité sanitaire supérieure sans résidu de produits phytosanitaires détectable, compétitive sur le marché européen ». Il s'agit d'un programme de recherche sur quatre ans, labellisé par le pôle de compétitivité Agri Sud-Ouest Innovation et dont le porteur de projet est l'entreprise BlueWhale. Le projet est soutenu par plusieurs financeurs : la Région Midi-Pyrénées, le Conseil Général du Tarn-et-Garonne, la

Communauté d'Agglomération du Grand Montauban, les entreprises partenaires et l'État par l'intermédiaire du Fonds Unique Interministériel (FUI).

Huit partenaires sont associés au sein d'un consortium. Ce consortium compte notamment trois entreprises, leaders dans leur domaine : BLUEWHALE (premier exportateur français et quatrième producteur européen de pommes), MAF AGROBIOTIC (leader mondial des équipements de calibrage et de conditionnement des pommes) et ABSOGER (deuxième constructeur mondial des équipements de mise sous atmosphère des chambres froides de conservation). Cinq équipes de recherche sont également présentes. Elles appartiennent à METEO France, à l'Université Paul Sabatier (Laboratoire de Génie Chimique et Laboratoire des Interactions Moléculaires et de la Réactivité Chimique et Photochimique), à l'Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques Et Technologiques (Laboratoire de Génie Chimique et Laboratoire de Chimie-Agroindustrielle) et à l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan (Département des Sciences Agronomiques et Agroalimentaires). Il est enfin important de souligner la présence d'appuis techniques tels que le CEFEL (Centre d'Expérimentation Fruits Et Légumes) de Montauban.

L'Ecole d'Ingénieurs de Purpan est en charge de proposer une alternative permettant la limitation des résidus de produits phytosanitaires appliqués en verger et/ou en sortie de verger contre quatre champignons : *Venturia inaequalis*, *Botrytis cinerea*, *Neofabraea alba*, et *Phytophthora syringae*. Pour ce faire, il a été choisi de tester un traitement innovant : l'application d'eau chargée en ozone.

L'ozone est un oxydant puissant capable de limiter le développement fongique. L'un des principaux intérêts de l'ozone est sa faible rémanence comparativement aux produits antifongiques conventionnels. Le temps de demi-vie de l'ozone est estimé à 20 minutes lorsque la molécule d'ozone est dissoute dans l'eau à 20 °C. Cette faible rémanence conduit à une absence de résidu après traitement (Khadre et al., 2001).

L'étude *in vitro* et *in vivo* des effets et mécanismes d'action de l'ozone, utilisé comme moyen de lutte contre des champignons pathogènes du pommier, constitue le sujet de la présente thèse. En conditions *in vitro*, il sera étudié l'action anti-fongique de l'ozone sur des suspensions de spores des différents champignons de l'étude : *V.inaequalis*, *B.cinerea*,

N.alba et *P.syringae*. Dans un second temps, l'application d'eau chargée en ozone sera évaluée en conditions contrôlées c'est-à-dire sur jeunes plants préalablement contaminés par les spores de *V.inaequalis*.

Les résultats de ces travaux doivent apporter des éléments de réponse pour permettre la validation de la candidature de l'eau chargée en ozone comme solution alternative aux produits phytosanitaires utilisés en verger.

La thèse présentée se structure en quatre chapitres. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique. La première partie décrit les quatre espèces fongiformes de l'étude et les moyens de lutte actuels employés pour limiter leur développement. Dans la deuxième partie, il est présenté la molécule d'ozone et ses principales caractéristiques. Il y est particulièrement développé l'état de l'art concernant l'effet anti-fongique de l'ozone à l'état gazeux et dissous dans l'eau. Un panorama des traitements à l'ozone en pré- et post-récolte y est également réalisé.

A chacune des étapes, de l'application de l'ozone sur spores jusqu'à l'application sur plantules, il a été développé et mis au point des techniques et protocoles spécifiques concernant tant les modalités d'application de l'ozone que la maîtrise des cultures fongiques ou des contaminations. Le deuxième chapitre en fait la présentation.

Le troisième chapitre expose les résultats de l'évaluation de l'effet anti-fongique de l'ozone sur les spores de *V.inaequalis*, *B.cinerea*, *N.alba* et *P.syringae*. Il présente également les performances de l'eau chargée en ozone sur différents stades de développement des spores de *V.inaequalis*. Afin d'expliquer les effets de l'ozone constatés, il y est également étudié les mécanismes impliqués dans l'action biocide de l'ozone sur les spores. Enfin, ce chapitre traite des expérimentations évaluant les performances de l'eau chargée en ozone pulvérisée sur jeunes plants de pommiers contaminés avec les spores de *V.inaequalis*. L'objectif est de s'assurer de l'efficacité du traitement *in vivo* ainsi que d'apporter des informations qui permettront de transférer, à terme, la technologie au verger.

L'ensemble des résultats est discuté dans le dernier chapitre. L'influence des paramètres étudiés sur l'efficacité anti-fongique de l'ozone est notamment rapportée. Un modèle de mode d'action de l'ozone sur spore fongique est également proposé. Enfin, les perspectives exposées auront une dimension scientifique mais aussi technique en vue d'un potentiel transfert de la technologie au verger.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

Ce premier chapitre a pour objectif de réaliser un état de l'art des différents objets d'étude du présent manuscrit. Il sera dans un premier temps réalisé un panorama des pathogènes du pommier au cœur du travail de thèse ainsi que les solutions actuellement utilisées pour limiter leur nuisance. Il sera ensuite exposé les caractéristiques et propriétés de l'ozone, alternative envisagée pour maîtriser les ravageurs précédemment cités.

I- Les maladies fongiques du pommier, cibles de l'étude

Les vergers de pommiers sont la cible de nombreux ravageurs. Parmi les principaux nuisibles, on compte des insectes tels que le carpocapse ou la tordeuse, des bactéries comme *Erwinia amylovora*, responsable du feu bactérien, et enfin des organismes fongiformes. La tavelure causée par *Venturia inaequalis* est aujourd'hui la principale maladie fongique trouvée au verger. Elle constitue un risque permanent pour l'arboriculteur. Les maladies de conservation, retrouvées sur fruits durant le stockage, sont souvent d'origine fongique. Elles seront également décrites dans ce chapitre.

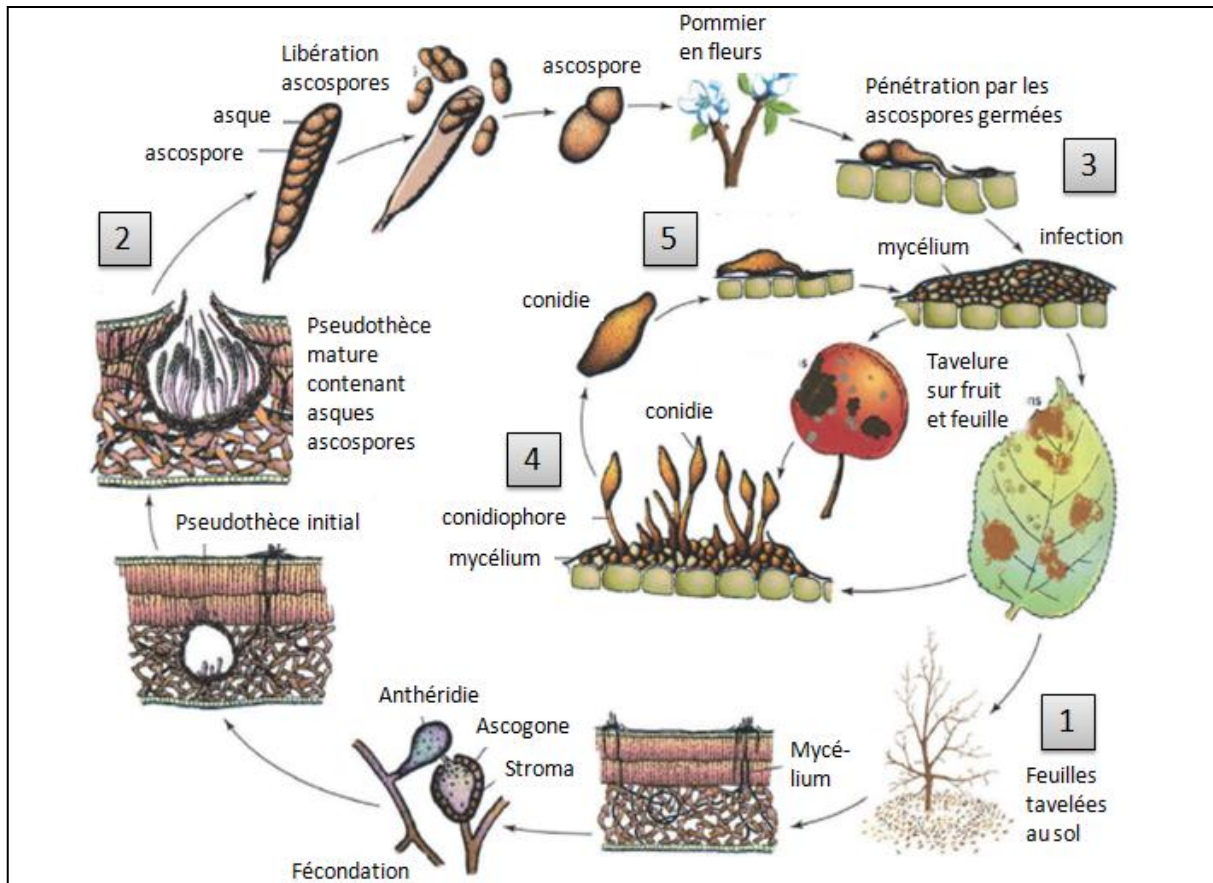
A- La tavelure : maladie causée par *V. inaequalis*

La tavelure affecte toutes les espèces botaniques de la sous-famille des *Maloideae* (pommiers, poiriers, cognassiers, néfliers, ...) et est aujourd'hui la principale maladie du pommier à travers le monde (Bowen et al., 2011). Elle est particulièrement virulente dans les régions tempérées, dont le printemps est froid et humide (MacHardy et al., 2001). Si elle tue rarement son hôte, elle peut diminuer de façon significative la quantité et la qualité de la production, les pertes pouvant être totales en l'absence de solution de contrôle. C'est pourquoi, 70 % des traitements fongicides appliqués au verger visent à protéger contre cette maladie. Son importance d'un point de vue économique, d'une part, et les conséquences environnementales ainsi que les risques pour la santé humaine engendrés par la lutte actuelle d'autre part, expliquent que ce champignon soit une cible privilégiée dans ce travail de thèse.

1) Description de la maladie

La tavelure est causée par un champignon, appartenant à la division des Ascomycètes, trouvé sous deux formes. La première forme correspond à la phase sexuée (dite « parfaite »), saprophytique, appelée *Venturia inaequalis* tandis que la seconde correspond au stade asexué (dit « imparfait »), parasite et nommé *Spilopezia pomorum* Fr (Bonne, 1971).

La tavelure hiverne dans les feuilles de pommier tombées au sol (Figure 1, étape 1), sous la forme de structures appelées pseudothèces (Bowen et al., 2011; MacHardy et al., 2001). Au début du printemps et suite à des épisodes pluvieux, les ascospores (ou spores sexuées) matures sont émises par les pseudothèces (Figure 1, étape 2) et constituent la contamination primaire. Leur libération se produit durant la phase de bourgeonnement et lors de l'apparition des feuilles du pommier (Brook, 1976), les organes les plus fragiles étant les jeunes feuilles et fruits (Xu & Robinson, 2005). La germination des ascospores nécessite la présence d'eau libre sur la surface du tissu cible (Bowen et al., 2011). Le tube germinatif s'introduit dans la cuticule grâce à un appressorium (Figure 1, étape 3) (Smereka, MacHardy, & Kausch, 1987).



Une structure pseudo-parenchymateuse, nommée stroma, se développe ensuite. C'est à partir de ce stroma que se différencient du mycélium et des conidiophores (Figure 1, étape 4). L'ensemble donne les très caractéristiques taches noires sur la surface des feuilles et fruits (Figures 2A et 2B).

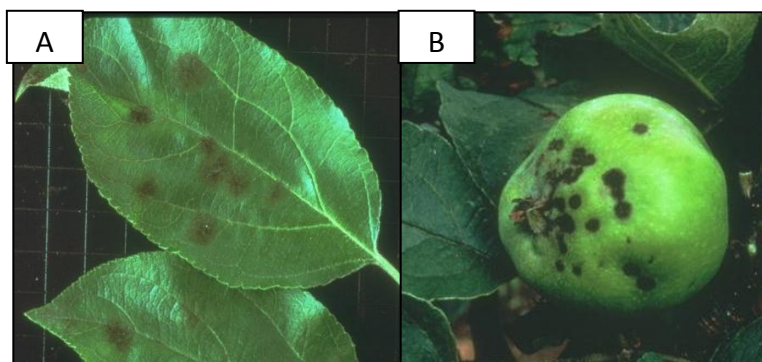


Figure 2 : Symptômes de la tavelure sur (A) feuilles (photographie BONDOUX P.) et (B) fruits (photographie BONDOUX P.).

Les conidiophores produisent les conidies (les mitospores ou spores asexuées, Figure 1, étape 5) qui constituent l'infection secondaire. Cette seconde phase contribue grandement à l'augmentation de la pression fongique pendant la période de développement du fruit (Bowen et al., 2011).

2) Moyens de lutte actuels

Les choix réalisés lors de la conception du verger peuvent avoir une incidence sur la capacité de développement de la maladie. Privilégier un site d'implantation bien ventilé, favorisant l'assèchement, permet de faciliter le contrôle des maladies (Jamar, 2011).

Au-delà de ces choix lors de l'implantation, le maintien d'un bon état sanitaire du verger demande des actions préventives et/ou curatives tout au long de l'année de production (Figure 3). Les pratiques préventives englobent des méthodes chimiques, biologiques et physiques (Figure 3B) et s'appuie également sur les résistances des cultivars (Figure 3A). Il est en effet judicieux de mélanger différents cultivars de pommiers, la virulence des souches du champignon différant d'un cultivar à l'autre (Carisse & Dewdney, 2002) ou encore de

privilégier les cultivars peu sensibles (Brun, Didelot, & Parisi, 2007). Les pratiques défensives demandent, quant à elles, des traitements fongiques (Figure 3C).

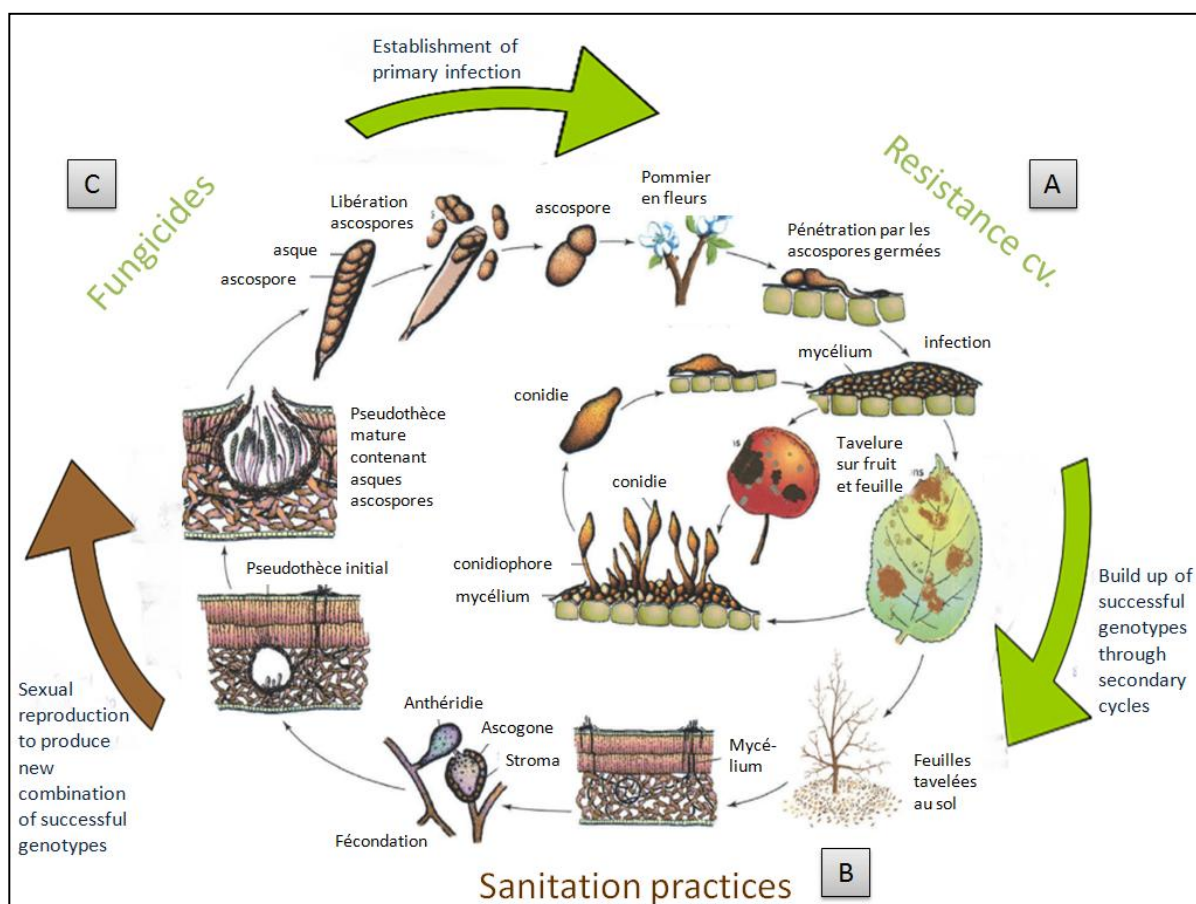


Figure 3 : Pratiques culturales mises en œuvre en verger pour neutraliser le développement de la tavelure (schéma amélioré par Jamar (2009) issu de la publication de MacHardy et al., (2001)).

➤ Pratiques sanitaires : en automne et en hiver (Figure 3B)

Afin de limiter le nombre de traitements durant le printemps, les pratiques visent en premier lieu l'inoculum primaire. Trois modes d'action coexistent :

- les actions physiques. La réduction de la masse des feuilles contaminées de la litière peut se faire par broyage des feuilles (Vincent, Rancourt, & Carisse, 2004), par leur retrait ou leur enfouissement (Gomez et al., 2004). Aujourd'hui, 80 % des arboriculteurs français procèdent au broyage des feuilles (Poullette, 2015).
- les actions chimiques. L'utilisation de l'urée permet d'accélérer la décomposition des feuilles de la litière (Holb, 2006) et agit également directement sur le pathogène. Il

est possible d'appliquer d'autres formes d'engrais azoté qui favorisent la décomposition des feuilles. Actuellement, cette pratique est suivie par 40 % des pomiculteurs. Trente pour cent d'entre eux cumulent broyage des feuilles et application d'engrais azoté (Poullette, 2015). Une étude a montré que l'application de chaux entraîne la réduction de la dose d'ascospores au printemps suivant de 92 % (Spotts et al., 1997). Enfin, le cuivre peut également être utilisé pour prévenir la tavelure. Il est alors appliqué à la tombée des feuilles. Deux tiers des agriculteurs font au moins un traitement cuprique par an (Poullette, 2015).

- l'utilisation des agents biologiques. Il a été prouvé que l'application de certains micro-organismes tels qu'*Athelia bombacina* (champignon) permet de réduire la production d'ascospores (Vincent et al., 2004). Pour autant, cette technique demande de nombreuses applications pour avoir un effet probant et son coût reste élevé.

Si ces actions sont effectives, 50 % des arboriculteurs français estiment que ces solutions prophylactiques ne permettent pas de réduire le nombre de traitements et seulement 30 % d'entre eux considèrent que cela permet d'éviter un à deux traitements par an, pour une moyenne de 16,4 traitements en 2011 (Poullette, 2015).

➤ **Protection chimique : au printemps et pendant l'été (Figure 3C)**

Malgré les efforts faits en amont, la tavelure est aujourd'hui à l'origine de 15 à 20 traitements phytosanitaires annuels selon les conditions météorologiques. Les fongicides sont appliqués au printemps, et si nécessaire l'été, aussi bien dans les vergers dits « conventionnels » que ceux où est déployée la protection intégrée ou encore l'agriculture biologique. Dans ce dernier cas, seuls certains produits à base de soufre et de cuivre sont autorisés (Holb, 2006). Aujourd'hui, les traitements sont majoritairement préventifs et sont appliqués en prévision d'épisodes pluvieux susceptibles de déclencher des projections et contaminations (Tableau 1).

Substances actives	Périodes d'application			Modes d'action		
	Pluviométrie annoncée	Préventif	Curatif	Produit de « contact »	Produit de « pénétration »	Mode d'interventions
Mancozèbe	Inférieure à 20 mm	✓		✓		Inhibition de la germination (Ineris, 2013; Ministère de l'agriculture, 2015)
Captan		✓		✓		
Thirame		✓		✓		
Dithianon		✓		✓		
Famille des anilinopyrimidines	Supérieure à 20 mm	✓	✓		✓	Perturbation de la synthèse des acides aminés (P. Leroux & Gredt, 1995)
Famille des strobilurines		✓	✓		✓	Blocage de la respiration cellulaire (Ineris, 2012)

Tableau 1 : Périodes d'application et modes d'action des principales substances actives utilisées en France contre la tavelure

Si la pluviométrie annoncée est inférieure à 20 mm, les fongicides préventifs appliqués sont des produits dits de contact. Ces fongicides de surface ne sont pas absorbés par la feuille (Figure 4) et la couverture n'est souvent que partielle. Les substances actives telles que le mancozèbe, le captane, le thirame ou le dithianon agissent en inhibant la germination des spores (Tableau 1).

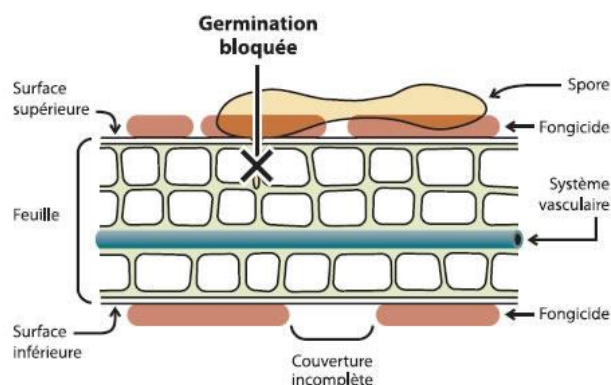


Figure 4 : Mode d'action des fongicides de contact (Carisse & Jobin, 2006)

Au-delà de 20 mm de pluviométrie, il est nécessaire d'appliquer des produits pénétrants : les gouttelettes de la substance active vont s'étendre sur la feuille et y pénétrer ce qui va permettre de limiter le lessivage par la pluie. Les substances actives de cette catégorie utilisées contre la tavelure appartiennent majoritairement à la famille des anilinyrimidines et des strobilurines. Ces dernières peuvent être appliquées dans les 36 premières heures après l'événement pluvieux. Leur mode d'action permet de limiter la croissance d'un champignon déjà présent (Figure 5). Ces fongicides curatifs agissent à un stade de développement du champignon plus avancé que pour les fongicides préventifs intervenant au niveau par exemple de la synthèse des acides aminés ou encore de la respiration cellulaire.

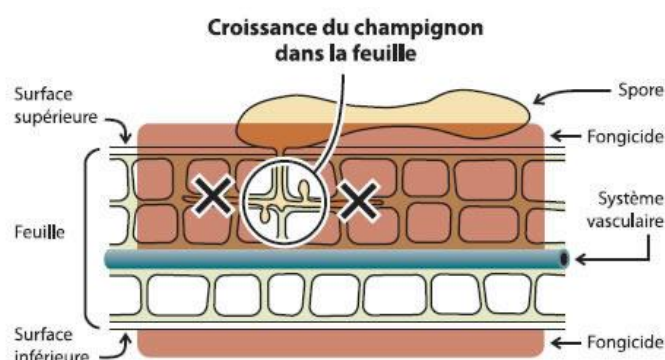


Figure 5 : Mode d'action des fongicides pénétrants (Carisse & Jobin, 2006)

Pour autant, *V.inaequalis* a développé des résistances à plusieurs molécules comme la dodine, le kresoximméthyl, le myclobutanil, ou encore le thiophanate-méthyl ainsi qu'à leur mélange (Chapman et al., 2011).

La nature préventive de la majorité des traitements actuels nécessite de maîtriser l'application en amont des épisodes pluvieux significatifs. Pour positionner au mieux les traitements, plusieurs outils d'aide à la décision sont à la disposition des centres techniques et des agriculteurs. Ainsi, la table de Mills (Mills et Laplace, 1951), qui constituait l'un des premiers outils disponibles, met en relation la durée d'humectation et la température pour donner le degré d'infection de la tavelure (Figure 6).

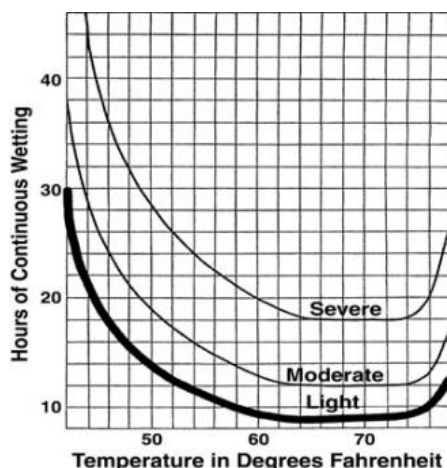


Figure 6 : Table de Mills et Laplace (1951), prédiction du niveau d'infection de la tavelure en fonction de la durée d'humectation et de la température.

Aujourd'hui sur les mêmes bases de prédiction mais avec plus de précisions et en intégrant un plus grand nombre de données météorologiques, des modèles de prédiction (tels que le logiciel RIMpro, modèle le plus utilisé en Europe) permettent de suivre le risque d'infection heure par heure et de déclencher des traitements préventifs (Jamar, 2011).

Ainsi, par le grand nombre de traitements anti-fongiques appliqués et les pertes occasionnées en cas de défaut de protection (tout fruit tavelé étant écarté (Brun et al., 2007)), la tavelure représente actuellement un réel problème pour la filière pomme.

Comme en témoigne la [Figure 7](#), la tavelure est la principale cible des fongicides/bactéricides appliqués en verger, quel que soit le bassin de production. En moyenne, 22,5 traitements fongicides-bactéricides ont été appliqués dans les vergers français en 2011. Soixante-dix pour cent de ces traitements étaient destinés à limiter le développement de la tavelure (Poullette, 2015).

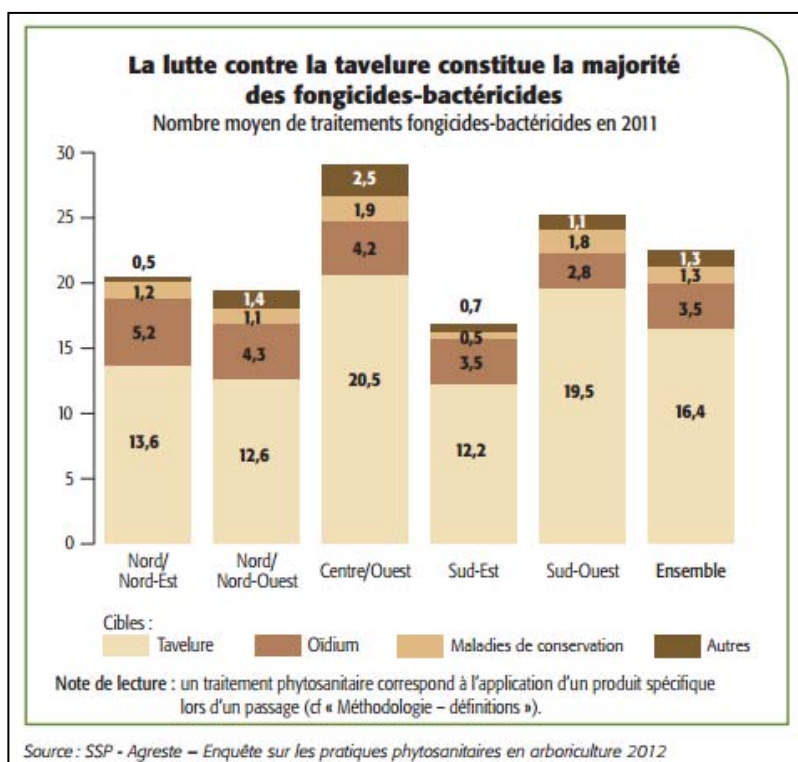


Figure 7 : Nombre moyen de fongicides employés en verger selon le bassin de production et le pathogène ciblé (Poullette, 2015)

Le bon niveau de connaissance du cycle biologique ainsi que les différents outils d'aide à la décision permettent d'envisager l'application de solutions innovantes, même curatives, à différents stades de vie du champignon. A l'heure où l'impact des traitements phytosanitaires sur l'environnement et les risques pour la santé humaine sont au cœur des préoccupations sociétales, proposer une alternative, peu néfaste pour l'environnement et l'applicateur, permettant de lutter efficacement contre la maladie, revêt un réel intérêt.

B- Les maladies de conservation

De nombreux agents peuvent être à l'origine de ces maladies latentes, qui se développent après récolte, durant la phase de conservation. Il a été choisi de cibler les pathogènes les plus répandus et présents dès le verger : *Botrytis cinerea* (pourriture grise), *Neofabraea alba* (gloeosporiose) et *Phytophthora spp.*

1) Description

a- La pourriture grise : *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea est un organisme polyphage, capable de s'attaquer à 230 espèces différentes légumières, horticoles et fruitières dont le pommier. Ce champignon est à l'origine de la pourriture grise (Figure 8B) qui entraîne des pertes économiques considérables (de l'ordre de 2 milliards de dollars par an dans le monde viticole par exemple). Il s'agit d'un champignon appartenant à la division des Ascomycètes. Son cycle se caractérise par deux stades : la phase sexuée, où il est appelé *Botryotinia fuckeliana*, et la forme asexuée, *Botrytis cinerea*. Exceptionnellement en mycologie, c'est le nom de la forme asexuée qui est usuellement employé pour nommer ce champignon (Ajouz, 2009).

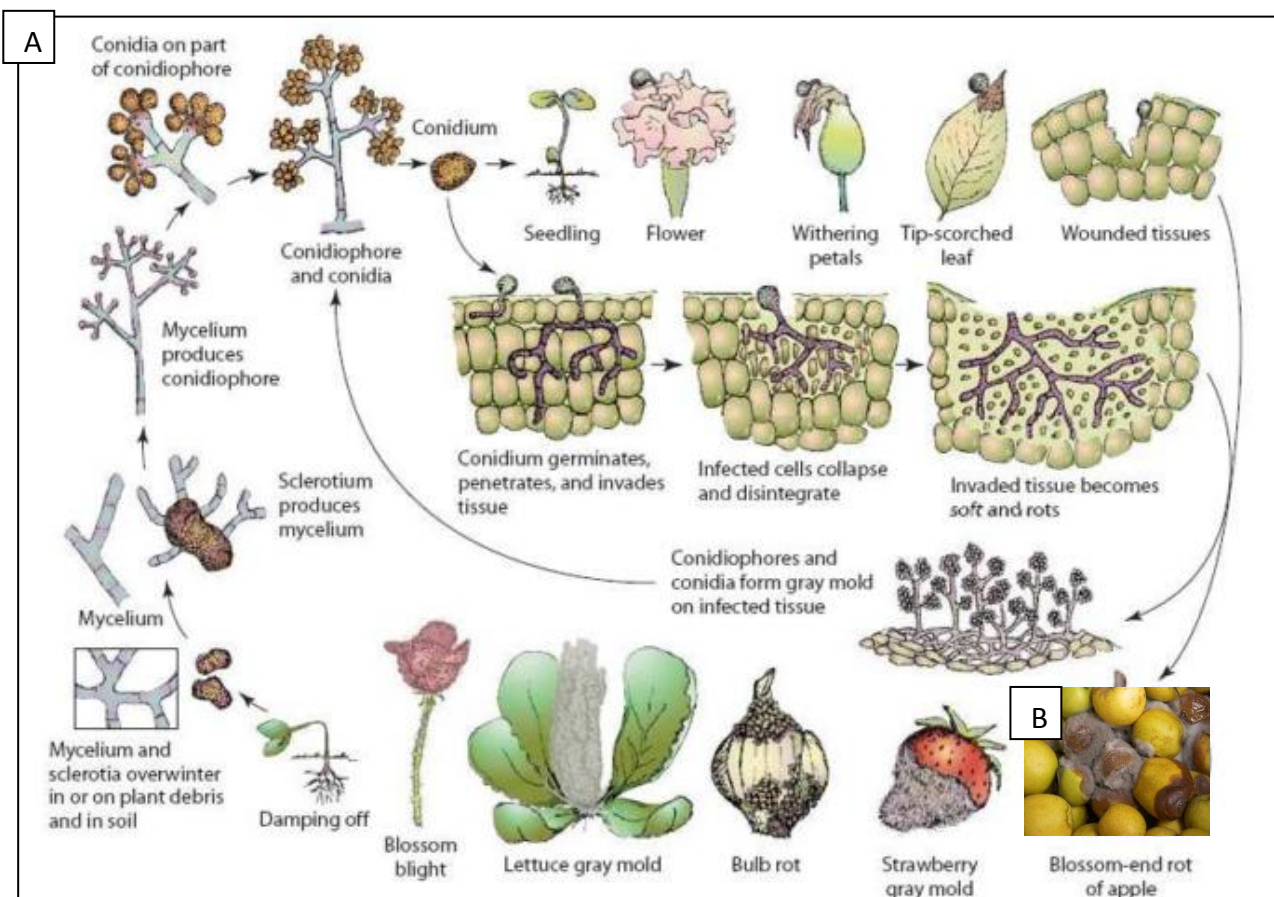


Figure 8 : (A) Cycle biologique de *Botrytis cinerea* (Agrios, 2005) et (B) maladie sur pommes

Tout comme pour la tavelure, le cycle biologique de cet ascomycète se divise en deux temps (Figure 8A). Le stade sexué se produit quand les conditions sont défavorables à la multiplication végétative. Une température trop élevée, une humidité relative réduite ou encore un appauvrissement nutritionnel du milieu peuvent en être la cause (Urbasch, 1983). Il apparaît alors des sclérotas. Au printemps, elles peuvent donner des conidies voire des apothécies. Leur obtention demande le croisement d'isolats sexuellement compatibles. Elles contiennent les asques qui eux-mêmes renferment les ascospores. Ces dernières peuvent être à l'origine de l'infestation primaire. Cependant, les apothécies sont rarement visibles en champs (Faretra et al., 1988).

Le stade asexué intervient quand les conditions sont favorables. Le mycélium donne alors des conidies. Elles sont issues de conidiophores qui sont à l'origine du feutrage gris. L'apparition des conidies, favorisée par un climat humide, peut survenir dès le printemps dans le cas de cultures de plein champ et peut être continue dans le cas de productions sous abri (Ajouz, 2009). Parasite de blessures sur pommes, *B.cinerea* se développe rapidement dès le début de la conservation, d'autant plus, si les fruits sont mûrs et le local de stockage est humide (Bondoux, 1992).

b- Les gloeosporioses : *Neofabraea alba*

Les gloeosporioses sont aujourd'hui considérées comme étant les principales maladies fongiques de conservation de la pomme. Si plusieurs champignons en sont à l'origine (notamment *N.alba*, *N.perennans* et *N.malicorticis*) (Gariépy et al., 2005), l'espèce dominante en France est *N.alba* (Giraud & Coureau, 2014). C'est pourquoi, seule cette espèce a été retenue pour la présente étude.

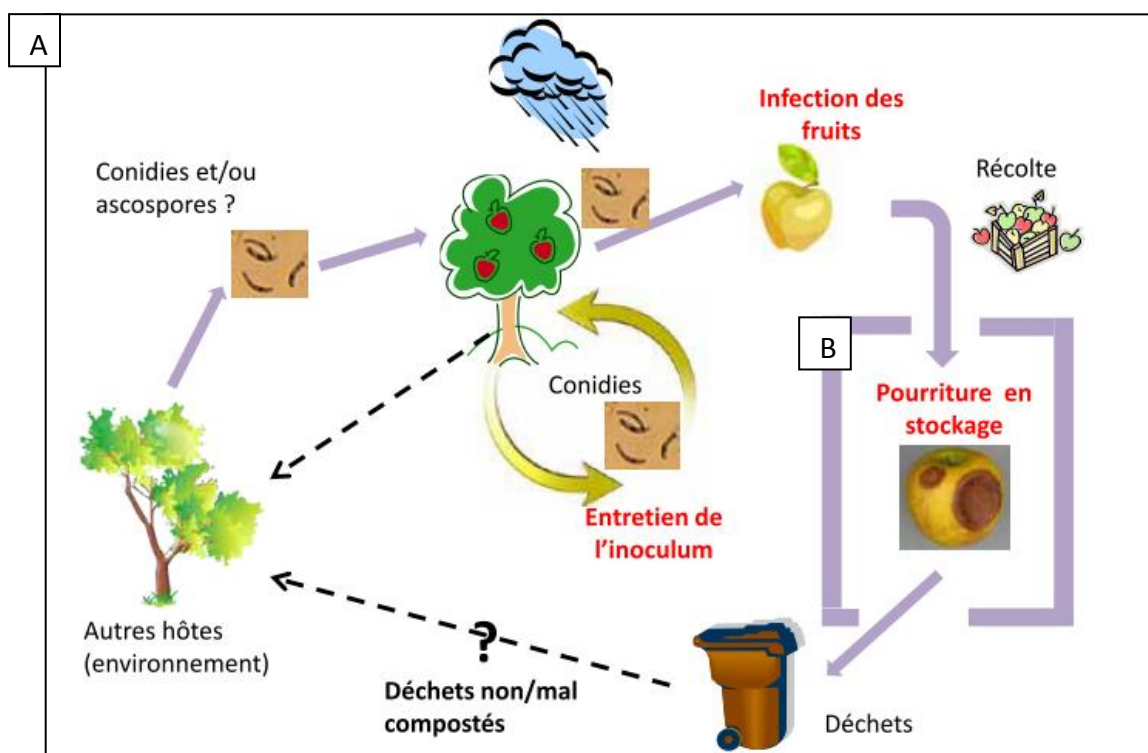


Figure 9 : (A) Cycle biologique supposé de *Neofabraea alba* (Giraud & Coureau, 2014) et (B) symptômes sur fruit

N.alba est un Ascomycète dont seule la forme asexuée est visible en verger. L'inoculum est présent dans les écorces ou les chancres (Figure 9A) de pommiers ou d'autres espèces telles que le chêne, le frêne ou encore le houx. En présence de pluie qui joue le rôle de vecteur, les spores infectent les lenticelles (Giraud & Coureau, 2014). Ces dernières se forment dès le mois de juillet et sont dès lors et jusqu'à la cueillette, réceptives aux agents pathogènes. Les contaminations se font cependant préférentiellement durant les dernières semaines avant la cueillette : du fait, d'une part, d'une plus grande sensibilité des lenticelles à cette période et d'autre part, en raison des conditions climatiques particulièrement propices au développement fongique, notamment pour les variétés tardives (allongement des périodes d'humidité et dépassement du point de rosée) (Bondoux, 1992). Plusieurs mois après le début du stockage (Spotts 1985), la maladie s'exprime avec l'apparition de taches rondes et uniformément marron (Figure 9B). Au centre de ces taches, apparaissent des pycnides, fructifications contenant les conidies asexuées. Les conidies sont actuellement considérées comme étant l'unique source des contaminations (Giraud & Coureau, 2014).

c- Phytophthora spp

Phytophthora syringae et *Phytophthora cactorum* sont deux pathogènes responsables d'une pourriture marron de la pomme (Figure 10B). L'optimum de croissance de *P.cactorum* a lieu entre mai et septembre tandis que *P.syringae* se développe préférentiellement de septembre à mai. C'est pourquoi, si les deux micro-organismes sont présents au moment de la cueillette, la période de récolte est plus propice au développement de *P.syringae* qui est effectivement à l'origine de la majorité des pourritures (Bondoux, 1992). C'est la raison pour laquelle *P.syringae* a été choisi pour cette étude.

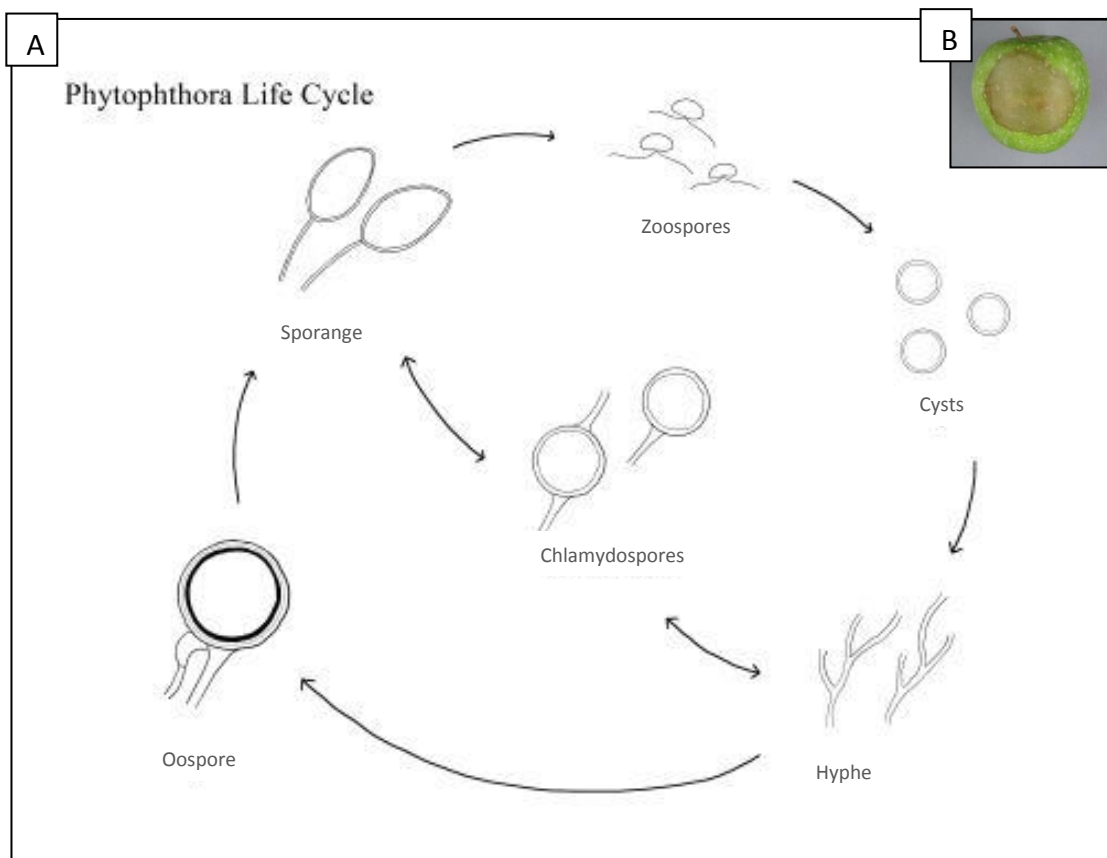


Figure 10 : (A) Cycle biologique du genre *Phytophthora* (Parke & Eberhart, 2015) et (B) symptômes sur fruits (Giraud, 2010)

La maladie peut entraîner un rougissement prématuré des feuilles, des rameaux plus courts et un feuillage chétif. Elle est alors appelée la « pourriture du collet » et peut induire à terme la mort de l'arbre. Les feuilles de pommiers tombées au sol constituent la principale source d'inoculum de la maladie (Harris, 1979). La terre est le vecteur des spores (sporocystes ou zoospores, très mobiles dans l'eau) ainsi que du mycélium (Figure 10A). Le

champignon pénètre *via* les lenticelles ou les blessures de fruits recouverts de terre ou éclaboussés. Les sporocystes semblent être les seuls contaminants pour le fruit (Mourichon et Bompeix 1979). Les fruits touchés sont donc préférentiellement ceux se trouvant proches du sol, à terre ou dans des caisses ayant stationné sur le sol du verger (Bondoux, 1992). Lorsque les pommes sont placées au froid, la maladie apparaît trois mois environ après la contamination. Les symptômes peuvent apparaître en moins de trois semaines si les fruits sont stockés à température ambiante.

2) Moyens de lutte utilisés en pré-récolte ou avant stockage

Les traitements contre les maladies de conservation sont majoritairement préventifs et réalisés en verger (Maxin et al. , 2012).

La lutte contre *B.cinerea* est essentiellement chimique (Ajouz, 2009). La maîtrise de ce pathogène en culture s'accompagne d'un très fort impact financier. En 2004, le marché mondial de produits de lutte contre *B.cinerea*, compte-tenu du large spectre de cultures contaminées par ce champignon, s'élevait à environ 20 millions de dollars par an (Elad & Stewart, 2004). Les traitements peuvent être appliqués en pré- et/ou post-récolte (Leroux, 2004). Dans le cas de la pomme, il s'agit de traitement en verger (Höhn et al., 2013). Des résistances à la majorité des molécules anti-fongiques utilisées contre ce champignon apparaissent. Les producteurs sont aujourd'hui à la recherche de solutions alternatives mais elles demeurent peu nombreuses et le plus souvent sont uniquement prophylactiques : sortir de la parcelle les organes atteints par la maladie (Dik & Wubben, 2004) ou raisonner la fertilisation (Abro et al., 2014). En production biologique, des propositions alternatives sont actuellement à l'étude (Ajouz, 2009) : les composés minéraux et organiques tels que par exemple le chitosan qui stimule les mécanismes de défense des végétaux (El Ghaouth et al., 1997), les extraits de plantes comme l'application de Milsana qui améliore le contrôle de la maladie (Schmitt et al., 2002) ou encore le recours à la lutte biologique (Dik & Elad, 1999). Ainsi, les micro-organismes tels que par exemple *Trichoderma*, *Bacillus* ou *Candida* sont efficaces en conditions contrôlées. En revanche, ces agents de biocontrôle montrent une efficacité instable en champs notamment liée à la variabilité des conditions climatiques ainsi qu'au manque de compétitivité des micro-organismes concernés (Elad & Stewart, 2004).

Le traitement des **gloeosporioses** se base majoritairement sur des applications en pré-récolte. En moyenne, trois traitements sont réalisés de 5-6 semaines à quelques jours avant la récolte. Des résistances de la part de *N.alba* ont été enregistrées dans plusieurs régions françaises notamment à la famille chimique des benzimidazoles. Le traitement des pommes fraîchement récoltées avec de l'eau chaude (48 à 52°C) constitue une alternative (Giraud & Coureau, 2014). Il peut être réalisé par trempage (Maxin et al., 2012). Les débits encore faibles des machines de trempage (20 palox/heure) cantonnent l'utilisation de cette technique à des petits volumes, mais des lignes de traitement par douchage sont en cours de mise au point.

Il est important d'ajouter que les atmosphères modifiées des chambres froides caractérisées par de très faibles teneurs en oxygène limitent le développement des gloeosporioses tout comme le 1-MCP (1-méthylcyclopropène), commercialisé sous le nom de SmartFresh (Giraud & Coureau, 2014).

La recrudescence de ***P.syringae*** est attribuée aux porte-greffes nanisants et aux modes de taille qui entraîne la production de pommes à proximité du sol et donc de l'inoculum. Aujourd'hui, il existe très peu de solutions techniques contre ce pathogène. Des stratégies essentiellement prophylactiques sont envisageables. Les fruits contaminés étant ceux ayant séjourné au sol ou à proximité de celui-ci, il est nécessaire de soustraire du verger tous les fruits nouvellement cueillis immédiatement après la récolte (Snowdon, 2010). D'autre part, il est préférable d'opter pour des porte-greffes peu sensibles, d'enherber les parcelles afin de limiter les projections de terre sur les arbres, d'optimiser les apports d'azote favorable à la vigueur végétative ou encore de veiller à l'état sanitaire des plants. Un produit nommé Bellis (constitué d'un mélange de pyrachlostrobine et de boscalid) fait actuellement l'objet de tests. Il est pulvérisé durant le dernier mois avant récolte et enregistre des résultats intéressants.

Aujourd'hui, la lutte contre la tavelure et les micro-organismes responsables des maladies de conservation repose principalement sur les produits phytosanitaires. Des résistances apparaissent et, même s'ils sont appliqués dans les meilleures conditions et en respectant les délais avant récolte, ces traitements sont sources de résidus sur fruits. Or, les fruits vendus ne doivent pas dépasser les Limites Maximales de Résidus, (règlement (CE) n° 396/2005), niveaux supérieurs de concentration de résidus de pesticides autorisés

légalement dans ou sur les denrées alimentaires, ni lavées ni épluchées. Ainsi, la présence de traitements rémanents en fin de campagne constitue une réelle préoccupation sanitaire. D'autre part, les produits phytosanitaires représentent en moyenne pour une exploitation d'un département producteur tel que le Tarn-et-Garonne environ 70 % des charges directes (hors coût de la main d'œuvre salariée) soit 1700 euros / hectare (Bigouin et al., 2013). Il existe donc aujourd'hui de vraies attentes sur la limitation de l'emploi des produits phytosanitaires.

Selon l'Anses (2010), les denrées alimentaires ainsi que l'eau distribuée sont les principales voies d'exposition de la population aux pesticides. Pour autant, les pesticides étant présents dans l'ensemble des compartiments de notre environnement (sol, air et eau), les Limites Maximales de Résidus et les normes des eaux potables, ne suffisent plus à garantir la sécurité des populations qui peuvent être confrontées aux pesticides par inhalation ou contact cutané au-delà de l'ingestion. Les personnes les plus à risques sont les applicateurs professionnels qui peuvent être sujets à des troubles ou pathologies à court ou long terme (Tableau 2).

	Effets aigus	Effets chroniques
Conséquences	A court terme	A long terme
Populations principalement concernées	- Appicateurs professionnels	- Appicateurs professionnels
Troubles ou pathologies	- Cutanés - Hépto-digestifs - Neurologiques et neuro-musculaires - Neuro-sensoriels et sur l'œil - Respiratoires - ORL - Généraux	- Cancers : augmentation des risques d'en développer un - Baisse de la fertilité - Troubles des développements des fœtus - Troubles neuropsychologiques (troubles de l'humeur, de l'anxiété, de la mémoire, de la concentration et apparition de suicides)

Tableau 2 : Effets aigus et chroniques des produits phytosanitaires sur l'Homme (Carnard & Magdelaine, 2010; Oliva et al., 2001; Petrelli & Mantovani, 2002).

C'est pourquoi, les attentes sociétales s'accroissent : la loi n°2009-967 du 3 août 2009, née du Grenelle de l'Environnement 1, régit la protection des captages pollués par les pesticides et préconise également la suppression des substances préoccupantes, la formation des applicateurs et la réduction de 50 %, si possible, des quantités de produits utilisés. Ces engagements sont mis en œuvre dans le cadre du Plan Ecophyto 2018.

Ainsi, proposer une solution de traitement alternative non rémanente pour limiter le développement des maladies fongiques de la pomme correspond à un vrai besoin. Est-ce qu'un traitement à base d'ozone, connu pour ses capacités biocides, pourrait se substituer à certains de ces traitements phytosanitaires sans pour autant laisser de traces détectables ?

II- L'ozone : un agent antifongique

La molécule d'ozone a été officiellement découverte par Shönbein en 1840. Lors d'expériences d'électrolyse, il décela une odeur et l'attribua à une nouvelle molécule qu'il baptisa ozone, nom provenant du grec « ozein » qui signifie « sentir ». Dès 1848, Hunt mis en évidence le fait qu'il s'agissait d'une molécule triatomique exclusivement constituée d'atomes d'oxygène. Sous l'impulsion de Von Siemens, le premier ozoneur apparut dès 1857. Basé sur l'application de décharges électriques dans un tube alimenté en air, il permettait déjà de convertir jusqu'à 8 % d'oxygène en ozone.

L'ozone est utilisé pour désinfecter les eaux depuis de nombreuses années. La ville de Nice a mis en place une station de traitement de l'eau de source de montagne à base d'ozone dès 1906. Aujourd'hui, de nombreuses usines d'eau potable utilisent cette technologie (Rice, 2012). En France, le procédé d'ozonation fait désormais partie du schéma classique du traitement des eaux.

L'emploi de l'ozone, sous sa forme gazeuse ou dissous dans l'eau, est actuellement en expansion du fait de l'augmentation de la demande en produits ayant peu d'impact sur l'environnement comparativement aux produits biocides conventionnels. Cet oxydant puissant, qui possède des propriétés désinfectantes reconnues, se caractérise en effet par une faible rémanence : l'excédent d'ozone se décompose rapidement en oxygène sans laisser de résidus détectables (O'Donnel et al., 2012).

Le nombre croissant d'études dans l'industrie agro-alimentaire est également lié au fait que l'ozone a obtenu le statut de Generally Recognized As Safe (GRAS) aux Etats-Unis : l'ozone peut donc y être utilisé légalement comme désinfectant dans l'agroalimentaire (Guzel-Seydim et al., 2004).

Plusieurs modes de génération de l'ozone et d'eau ozonée existent aujourd'hui. Ils feront l'objet d'une description détaillée avant de s'intéresser aux caractéristiques physico-chimiques et aux propriétés désinfectantes de l'ozone. Enfin, il sera recensé les applications actuelles de cette molécule comme agent anti-fongique.

A- Modes de génération de l'ozone et de l'eau chargée en ozone

1) Production de l'ozone

La réaction globale (1) de formation de l'ozone est endothermique (Masschelein, 1998) :



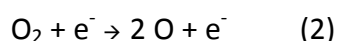
Avec en phase gaz $\Delta H^\circ = + 142,2 \text{ kJ/mol}$ (sous $1,013 \times 10^5 \text{ Pa}$)

Et $\Delta S^\circ = - 69,9 \text{ kJ/mol} \cdot \text{K}$

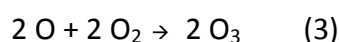
Aujourd'hui, plusieurs solutions existent pour générer de l'ozone. Principalement, l'ozone est produit par décharge Corona, par radiation UV ou par voie électrochimique.

a- Par décharge Corona

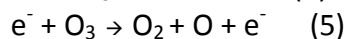
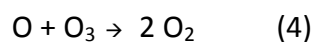
Selon le même principe que celui développé par Von Siemens, il s'agit de faire circuler du gaz qui contient de l'oxygène - sec, sans huile ou particules de poussière - au travers d'un champ électrique hautement énergétique entre deux électrodes. Du fait de l'énergie apportée, la décharge entraîne la division de la molécule de dioxygène en atomes d'oxygène (2).



Ces derniers vont se combiner avec des molécules de dioxygène encore intactes et donner ainsi de l'O₃ (3) (Tapp & Rice, 2012).



Parallèlement, l'ozone se décompose en oxygène. Les atomes d'oxygène ou les électrons libres réagissent avec les molécules d'ozone présentes comme le montrent respectivement les équations (4) et (5).



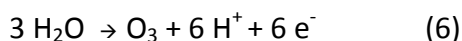
Ainsi, l'efficacité de la méthode par décharge Corona est le résultat de la compétition entre les réactions (2)-(3) et (4)-(5). Elle est tributaire de plusieurs facteurs tels que la température du gaz entrant, la concentration en oxygène, la présence de contaminants dans la phase gazeuse, la concentration en ozone, du débit ou encore de la puissance électrique (Da Silva et al., 2003).

b- Par radiation UV

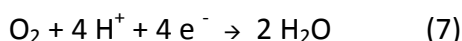
Le principe est similaire à celui qui se produit dans la stratosphère lorsque du dioxygène est transformé en ozone sous l'action de rayons ultra-violets. La longueur d'onde ne doit pas excéder 200 nm et il est souvent utilisé des lampes travaillant à 185 nm. L'action du rayon UV entraîne la photodissociation d'une molécule de dioxygène. Les atomes d'oxygène ainsi obtenus se combinent aux molécules d'O₂ voisines et forment ainsi de l'O₃ (Bourgin, 2011; Tapp & Rice, 2012). Cette technique est moins efficace que la précédente pour produire des quantités importantes d'ozone. En revanche, elle permet de générer des concentrations faibles et d'atteindre une grande précision du fait des réglages fins de la puissance de la lampe (Da Silva et al., 2003).

c- Par voie électrochimique

L'ozone est ici produit durant la décomposition électrolytique de l'eau au niveau de l'anode selon la réaction suivante (6) :



En parallèle, l'oxygène moléculaire est réduit en eau au niveau de la cathode (7).



Selon Da Silva et al. (2003), les différents procédés employant cette voie électrochimique permettent de produire des quantités d’ozone supérieures aux deux modes de génération précédemment présentés. En revanche, cette technique reste actuellement onéreuse.

L’ozone peut être utilisé directement sous forme gazeuse ou être employé en étant dissous dans de l’eau. Cela demande donc des techniques de transfert de l’ozone dans la phase aqueuse qui sont décrites dans le paragraphe suivant.

2) Ozonation de l’eau

Deux technologies sont couramment utilisées pour transférer l’ozone dans l’eau : la diffusion du gaz dans le liquide au travers d’un système poreux (bullage) ou le recours à un injecteur type Venturi.

Dans le cas du **bullage** (Figure 11A), l’ozone gazeux est introduit dans la solution à enrichir au travers d’un fritté (Figure 11B). L’objectif est d’obtenir une dispersion homogène des bulles de gaz à la base de la colonne d’eau. Le transfert de matière se fait durant l’ascension des bulles dans la colonne. Une porosité fine permet la production de bulles fines ce qui améliore le transfert de l’ozone dans l’eau. L’obtention de bulles de petites tailles augmente la surface d’échange gaz-liquide tandis que la remontée lente des bulles favorise un temps de contact gaz-liquide accru (Tapp & Rice, 2012).

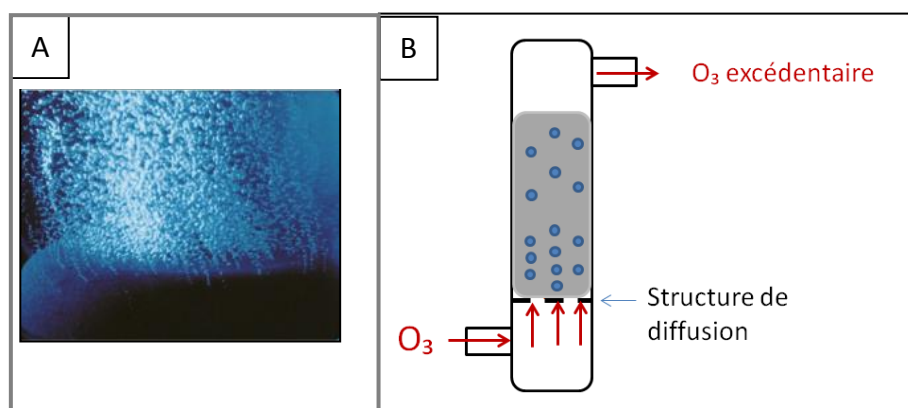


Figure 11 : (A) Photographie d’un diffuseur (Dome diffusers KTLTM, Ozonia) et (B) schéma d’un tube à fritté

Un **injecteur Venturi** (Figure 12) est un tube comportant une section réduite sur laquelle est raccordé le tuyau d'arrivée de l'ozone gazeux. L'eau entre dans l'injecteur à un débit constant. Lorsque le fluide arrive au niveau de la restriction, le débit ne changeant pas, la vitesse augmente. Cette augmentation entraîne une chute de la pression permettant ainsi l'aspiration de l'ozone. Le gaz se répand rapidement dans le liquide sous forme de petites bulles. Le flux est alors très agité ce qui permet un bon mélange de liquide et du gaz (Tapp & Rice, 2012).

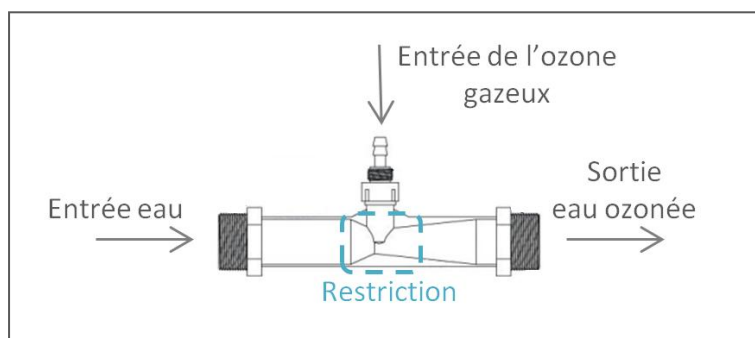


Figure 12 : Schéma d'un injecteur Venturi

D'autres solutions techniques existent telles que les mélangeurs statiques, les tubes en U, les réacteurs à turbine ou encore les colonnes à garnissage (Figures 13 A à D). L'injection de l'ozone dans l'eau est optimisée par l'augmentation de la surface d'échange entre gaz et liquide ou en forçant le transfert à l'aide de pompes.

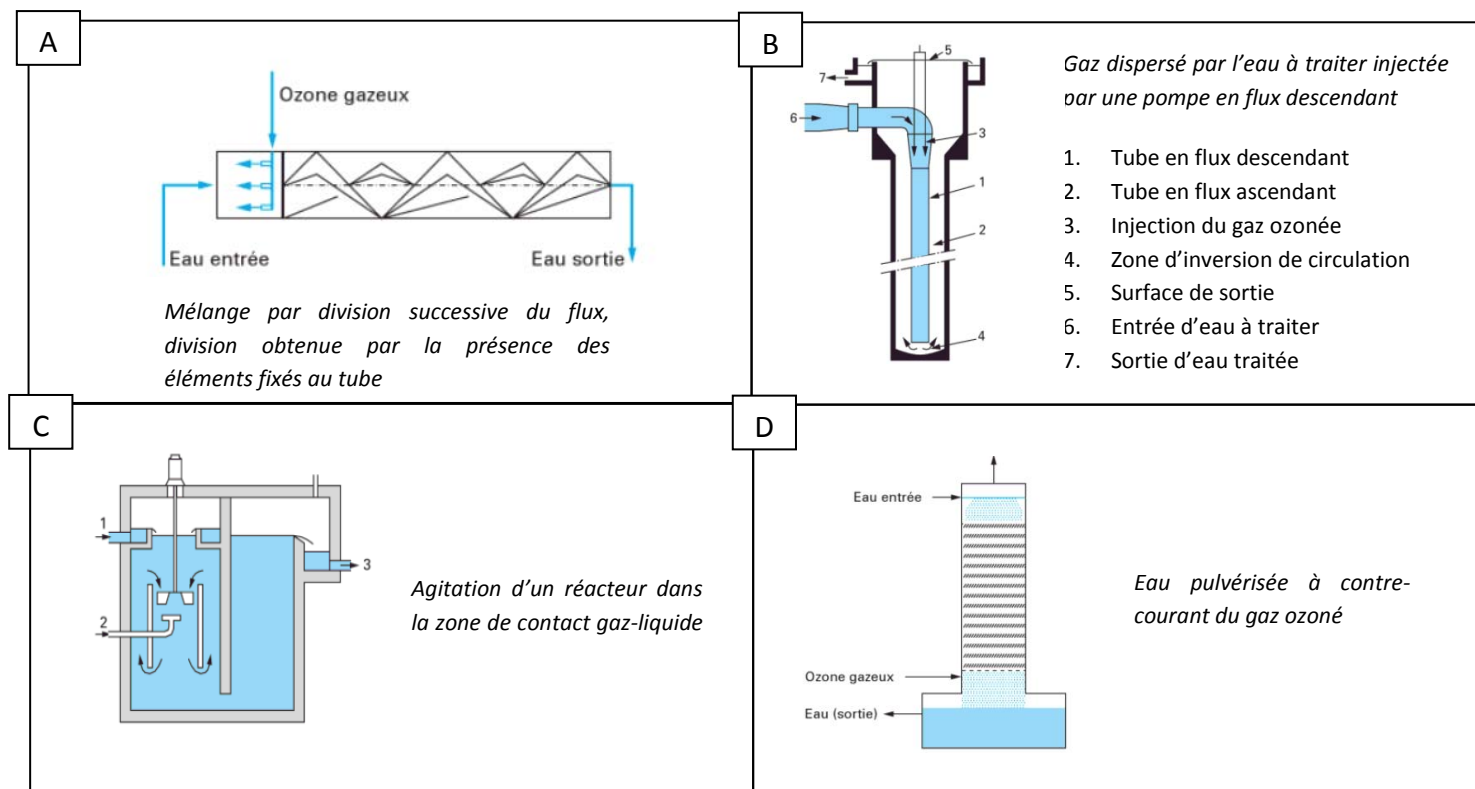


Figure 13 : Solutions techniques permettant le transfert gaz-liquide : (A) Mélangeur statique (B) Tube en U (C) Réacteur à turbine (D) Colonne à garnissage (Baig & Mouchet, 2010).

B- Propriétés physico-chimiques de l'ozone

1) Sa structure moléculaire

L'ozone est une molécule triatomique constituée exclusivement d'atomes d'oxygène (Greene et al., 2012). L'oxygène central se trouve à équidistance des deux autres oxygènes atomiques. Quatre mésomères ou structures de résonance sont envisageables (Figure 14).

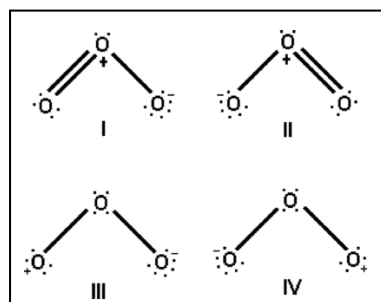


Figure 14 : Structures de résonance de la molécule d'ozone proposées par Oehlschlaeger en 1978 (Guzel-Seydim et al., 2004).

Ainsi, au vu de sa structure, l'ozone peut être considéré comme un agent électrophile ou nucléophile ce qui lui confère une très haute réactivité.

L'ozone se caractérise également par un fort potentiel d'oxydation comme le prouve son classement comparativement à d'autres espèces oxydantes (Tableau 3).

Espèce	Potentiel d'oxydation (V)
Fluor	3,06
Radical hydroxyle	2,8
Atome d'oxygène	2,42
Ozone	2,07
Peroxyde d'hydrogène	1,77
Radical perhydroxyle	1,70
Acide hypochloreux	1,49
Chlore	1,36
Dioxyde de chlore	1,27
Dioxygène	1,23

Tableau 3 : Potentiels d'oxydation relatifs au potentiel de l'électrode standard à hydrogène (Hunsberger J.F., 1977)

Enfin, les principales constantes de l’ozone sont les suivantes (Tableau 4).

Paramètre	Valeur
Point d’ébullition	-111,9 °C
Point de fusion	-192,5 °C
Température Critique	-12,1 °C
Pression Critique	54,6 atm

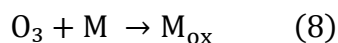
Tableau 4 : Principales constantes physiques de l’ozone déterminées par Manley et Niegowski en 1967 (Guzel-Seydim et al., 2004).

2) Sa réactivité

L’interaction avec les composés présents dans le milieu traité peut se faire selon deux voies (Greene et al., 2012; Khadre et al., 2001).

➤ La voie « directe » ou « moléculaire »

Elle correspond à l’attaque du composé (M) par l’ozone moléculaire (8) (Hoigne & Bader, 1983).



La vitesse à laquelle les matières dissoutes réagissent avec l’ozone augmente proportionnellement aux concentrations d’ozone dissous $[\text{O}_3]$ et des matières dissoutes $[\text{M}]$. Le temps d’ozonation pendant lequel la concentration de M est réduite à chaque fois à 37 % de la valeur précédente est égal à (Hoigne, 1991) :

$$\tau_{\text{M}} = 1/(k_{\text{M}}[\text{O}_3]) \quad (9)$$

k_{M} est la constante de vitesse de la réaction.

L’ozone peut tout d’abord réagir en tant que dipôle. La molécule se lie alors facilement avec les liaisons éthyléniques suivant un mécanisme de cycloaddition (Figure 15) appelé également « Mécanisme de Criegee ». Ce mécanisme donne lieu à un ozonide instable. Ce dernier se décompose ensuite en aldéhydes et/ou cétones et en peroxyde d’hydrogène.

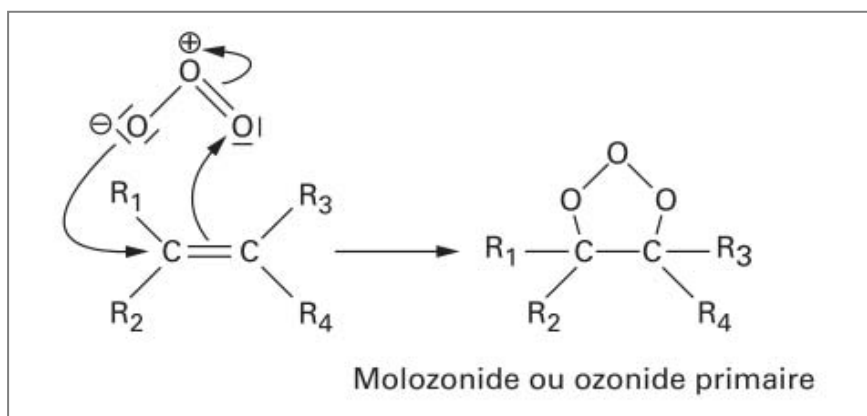
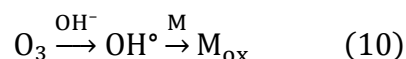


Figure 15 : Cycloaddition de l'ozone sur une liaison éthylénique (Baig & Mouchet, 2010)

L'ozone peut agir également comme un réactif électrophile ou nucléophile (Baig & Mouchet, 2010). L'attaque électrophile intervient sur des molécules à forte densité électronique.

➤ **La voie « indirecte » ou « radicalaire »**

Elle consiste en la décomposition de l'ozone en radicaux hydroxyles. Ce sont ces derniers qui entrent en contact avec le composé (M) et qui entraînent sa dégradation grâce à leur fort pouvoir oxydant (10).



Les radicaux hydroxyles résultant de la décomposition de l'ozone ont une durée de vie très courte (estimée à 10^{-10} secondes dans les systèmes biologiques et de l'ordre de la seconde dans l'atmosphère (Ramade, 2011)). Pour autant, ce sont des oxydants plus puissants que l'ozone. Réagissant très rapidement avec d'autres molécules, ils sont considérés comme étant très instables.

La transformation de l'ozone en radicaux hydroxyles peut être provoquée par l'utilisation d'un activateur tel que le peroxyde d'hydrogène ou encore les rayonnements UV. L'objectif est alors de produire une grande quantité de molécules hautement réactives. Il s'agit des Procédés d'Oxydation Avancée ou POA (Greene et al., 2012).

3) Sa solubilité et sa stabilité

La solubilité correspond à la faculté d'une substance à passer en solution. A l'équilibre, la pression partielle d'un gaz au-dessus d'un liquide détermine la concentration maximale que présentera ce gaz dans le liquide. L'ozone est à même de se **solubiliser** dans un grand nombre de solvants ainsi que dans l'eau. Dans ce dernier cas, la solubilité de l'O₃ est 13 fois plus importante que l'oxygène. L'ozone se solubilise également mieux que l'azote mais moins bien que le dioxyde de carbone et le chlore (Khadre et al., 2001). La solubilité d'un gaz qui n'est que partiellement soluble dans l'eau peut être décrite par l'équation d'Henry (Roth & Sullivan, 1981).

Cette équation (11) permet d'estimer la concentration de l'ozone dissous dans l'eau (en mg/L) :

$$[O_3]_l^* = \frac{M_{H_2O}}{M_{H_2O}} \times \frac{R \times T}{He} \times [O_3]_g \quad (11)$$

où M_{H_2O} correspond à la masse molaire de l'eau en g/mol, ρ_{H_2O} correspond à la masse volumique de l'eau en kg/m³, R est la constante des gaz parfaits (0,082 L.atm.mol⁻¹.K⁻¹), T est la température en Kelvin, et He est la constante d'Henry en atm/fraction molaire d'ozone dans l'eau. Cette dernière est obtenue en appliquant l'équation (12) de Roth et Sullivan (Roth & Sullivan, 1981) :

$$He = 3,84 \times 10^7 \times [OH^-]^{0.035} \times \exp\left(\frac{-2428}{T}\right) \quad (12)$$

où $[OH^-] = 10^{(pH-14)}$ et s'exprime en mol.L⁻¹.

L'équation d'Henry traduit ainsi le fait, qu'à une température donnée, la quantité de gaz dans la solution est linéairement proportionnelle à celle de sa pression partielle.

D'autre part, la solubilité est grandement influencée par la température de l'eau comme le montrent les données du [Tableau 5](#). Plus la température s'élève, moins la solubilité est importante.

Température (en °C)	Solubilité (litre d'ozone/litre d'eau)
0	0,640
15	0,456
27	0,270
40	0,112
60	0,000

Tableau 5 : Relation entre la température et la solubilité de l'ozone dans l'eau proposée par Rice, R. G., Robson, C. M., Miller, G. W., et Hill, A. G en 1981 (Guzel-Seydim et al., 2004). 53

De même, plus la taille des bulles d’ozone dans le liquide est petite, plus la surface d’échange gaz-liquide augmente et plus le transfert est prononcé. Le transfert est encore renforcé par un temps de contact long entre bulles et liquide. Plusieurs modèles de transferts existent dans la littérature. Ils se différencient par leurs hypothèses quant au comportement du liquide ce qui donne lieu à des coefficients de transfert k_L de matière distincts. On trouve notamment le modèle du double film (Figure 16) de Lewis et Whitman (1924) qui est applicable à des systèmes diphasiques (gaz-liquide ou liquide-liquide). Il repose notamment sur l’hypothèse qu’il existe entre les deux phases en contact une interface sans épaisseur physique où les concentrations de l’espèce A sont à l’équilibre et suivent la loi d’Henry, $y_i = mx_i$. De part et d’autre de cette interface apparaît un film où le transport de la molécule A se fait à régime permanent par diffusion moléculaire. Chaque film se caractérise par un coefficient de transfert distinct (K_L^0 du côté liquide et K_G^0 du côté gazeux). Au-delà de ces deux films, les concentrations sont constantes dans tout le volume (Roustan, 2003).

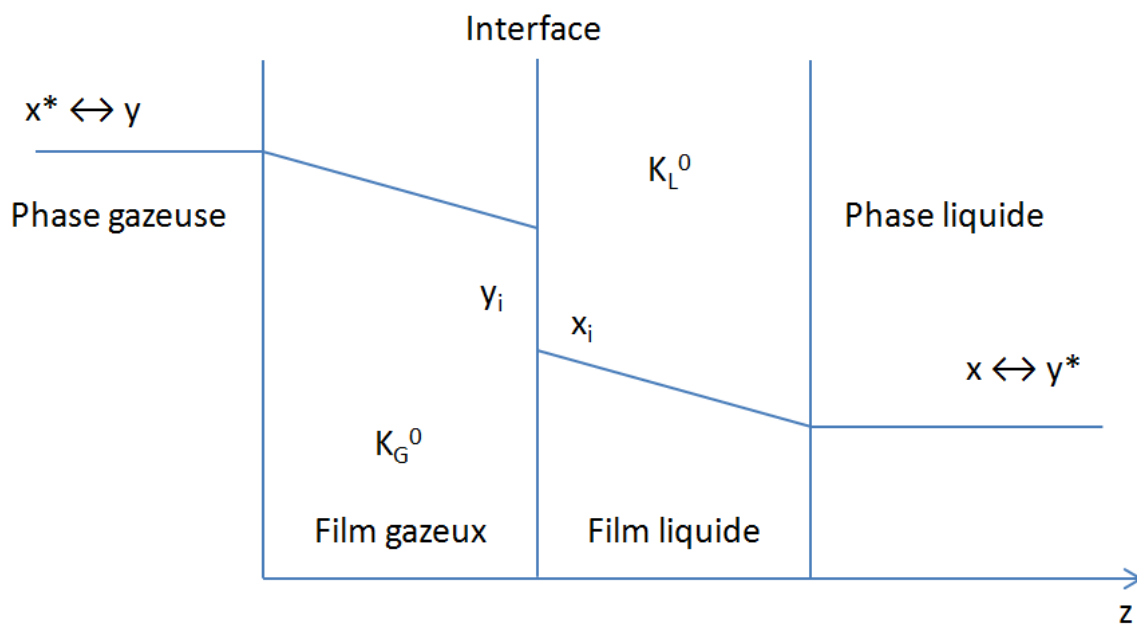


Figure 16 : Représentation du modèle du double film proposé par Lewis et Whitman en 1924 (représentation issue du livre Roustan (2003)).

Après calcul du flux à travers un seul film, le flux de matière N_A au travers du modèle double film peut s’écrire (13) :

$$N_A = K_L^0 (x_i - x) = K_G^0 (y_i - y) \quad (13)$$

La **stabilité** de l’ozone dans l’eau dépend de la température, du pH, de la pression partielle en ozone et surtout de la pureté de l’eau (Bourgin, 2011). Le temps de demi-vie en phase aqueuse est plus faible qu’en phase gazeuse (Guzel-Seydim et al., 2004) comme le montre le [Tableau 6](#).

Ozone gazeux		Ozone aqueux	
Température (°C)	Temps de demi-vie	Température (°C)	Temps de demi-vie
-50	3 mois	15	30 minutes
-35	18 jours	20	20 minutes
-25	8 jours	25	15 minutes
20	3 jours	30	12 minutes
120	1,5 heures	35	8 minutes

Tableau 6 : Temps de demi-vie selon la température et la forme de l’ozone (Miller, Silva, & Brandão, 2013)

A 20°C, la demi-vie dans de l’eau distillée n’excède pas trente minutes (Khadre et al., 2001). L’ozone se dégrade en effet rapidement en oxygène sans laisser de résidus. Cette dégradation est d’autant plus importante que la solution est impure (Greene et al., 2012). En présence de composés organiques dans la solution ozonée, les sous-produits d’altérations sont des aldéhydes, des cétones ou encore des acides carboxyliques. Cette faible stabilité limite les possibilités de transport et de conditionnement mais c’est aussi un avantage : le traitement à l’ozone présente une faible rémanence et ne nécessite pas de zone spécifique de stockage.

Les propriétés physico-chimiques de la molécule d’ozone lui confèrent une haute réactivité et un pouvoir oxydant important qui sont aujourd’hui mis à contribution pour désinfecter et décontaminer. Sa faible rémanence et l’absence de sous-produits dangereux en font un candidat privilégié pour de nombreuses applications et une alternative plus respectueuse de l’environnement que d’autres agents désinfectants.

C- Propriétés antifongiques de l'ozone

1) Application de l'ozone *in vitro*

a- Effet antifongique de l'ozone

Les propriétés désinfectantes de l'ozone ont été testées sur de nombreux micro-organismes. Son effet biocide a été vérifié sur des espèces de bactéries, champignons, virus, protozoaires ainsi que sur spores bactériennes et fongiques (Greene et al., 2012; Guzel-Seydim et al., 2004; Khadre et al., 2001).

De nombreux facteurs influencent l'efficacité d'un traitement à l'ozone. Au-delà du type de matrice (fruits, légumes, ...) sur laquelle l'ozone est appliqué, l'efficacité d'un traitement à base d'ozone dépend :

- du **micro-organisme visé**. La sensibilité est inhérente au type de micro-organismes. Les bactéries sont plus sensibles que les champignons. C'est notamment ce que prouvent les travaux de Moore et al. (2000) réalisés sur bactéries et levures. L'application pendant 1 heure de l'ozone gazeux concentré à 2 ppm permet de réduire de plus de 6 Log la viabilité d'*E.coli*. Cette réduction atteint seulement 0,57 Log pour la levure *Rhodotorula rubra*. Selon les auteurs, la présence d'une fine paroi cellulaire (généralement de 100 à 200 nm) chez la levure pourrait offrir une protection cellulaire permettant de retarder la pénétration de l'ozone jusqu'aux sites actifs de la membrane plasmique. De même, Restaino et al. (1995) ont montré que l'application d'eau ozonée cause, dans leurs conditions de traitement, la mort de 4,5 Log de cellules de deux espèces de levures (*Candida albicans* et *Zygosaccharomyces bailii*). Le même traitement entraîne la mort de moins d'1 Log de spores d'*Aspergillus niger* même après 5 minutes d'exposition.
- de sa **quantité** et de son **stade de développement**. Antony-Babu & Singleton (2009) ont testé l'effet de l'ozone gazeux sur le développement fongique à partir de suspensions de spores ou de mycelium de deux *Aspergilli*, *A.nidulans* et *A.ochraceus*. L'ozone est plus efficace pour réduire le développement à partir d'un inoculum fait exclusivement de spores que pour limiter le développement issu d'un inoculum mycélien.

- de la **forme sous laquelle l’ozone est appliqué**. Les champignons sont par exemple plus sensibles à l’eau chargée en ozone qu’à l’ozone gazeux (Miller et al., 2013). Par ailleurs, renouveler l’ozone consommé permet d’améliorer les performances du traitement. Plonger des poivrons et laitues dans de l’eau continuellement ozonée diminue leur charge microbienne respectivement de 3,04 et 3,27 Log après 30 minutes d’exposition tandis que les tremper dans de l’eau préalablement chargée en ozone réduit la quantité de micro-organismes respectivement de 0,67 et 0,85 Log (Alexopoulos et al., 2013).

i. Effet de l’application d’ozone gazeux

Dans la majorité des études *in vitro* réalisées sur champignons, l’ozone est sous sa forme gazeuse. Le [Tableau 7](#) en fait une synthèse.

Conditions de traitements	Espèces ciblées	Paramètres <i>in vitro</i> évalués	Références
Concentrations : 450 et 600 ppb Températures : 5 et 20 °C Durées d’application : 0, 6, 24, 30 et 48 heures	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Viabilité des spores Développement mycélien	(Sharpe et al., 2009)
Concentrations : 0,2 ; 200 et 300 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ Durées d’application : 12 jours pour 0,2 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ et 10 minutes pour 200 et 300 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Développement mycélien à partir d’inocula de spores ou de mycélium Production de spores Germination de spores Biomasse fongique	(Antony-Babu & Singleton, 2009)
Concentration : 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Durées d’application : 3 heures puis 2* 1 heure	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Réponse de colonies d’âges différents	(Zotti et al., 2008)
Concentration : 0,05 ppm Température : 5 °C Durée d’application : 4 jours	<i>Penicillium italicum</i> <i>Penicillium digitatum</i>	Croissance radiale	(Palou et al., 2001)
Concentration : 150 nl/L Température : 2 °C Durée d’application : 100 jours	<i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium digitatum</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium italicum</i>	Réponse selon les espèces fongiques Et âge de la culture prélevée	(Ames et al., 2013)

Concentration : 0,3 µL/L Température : 0 °C Durées d'application : 2, 8, 24, 72 et 144 heures Humidité relative : 95 %	<i>Botrytis cinerea</i>	Développement du mycélium Viabilité des spores	(Minas et al., 2010)
Concentrations : 50, 100 et 200 ppm Durée d'application : 30 min	<i>Fusarium verticillioides</i>	Germination des spores Croissance radiale du mycélium	(Mylona et al., 2014)
Concentrations : 0 ; 1,5 ; 2,5 ; 3,5 ; 5,0 µL/L Température : 25 °C Durée d'application : 24 heures	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Germination des spores Dégradation mitochondriale	(M. K. Ong & Ali, 2015)
Concentrations : 200 à 350 µL/L Température : 25 °C Humidités relatives : 35, 75 et 95 %	<i>Penicillium digitatum</i> <i>Penicillium italicum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Germination des spores	(Ozkan et al., 2011)

Tableau 7 : Inventaire des publications utilisant de l’ozone gazeux sur espèces fongiques *in vitro*

➤ **Effet de la température et du temps d'exposition à l'ozone gazeux**

Sharpe et al. (2009) ont évalué l'effet de l'exposition de *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum* à l'ozone gazeux. Pour cela, les spores ou le mycélium, déposés sur boîtes de Pétri, ont été exposés à deux concentrations d'ozone, 450 et 600 ppb, à 5 ou 20 °C pendant 0, 6, 24, 30 ou 48 heures. Si les développements mycéliens de *B.cinerea* et de *S.sclerotiorum* ne sont pas significativement différents des contrôles, les auteurs constatent toutefois que la hauteur du mycélium de *B.cinerea* est significativement réduite après 48 heures d'exposition à 20 °C pour les deux concentrations de l'étude. Une observation au microscope a permis de vérifier l'absence de conidiophores sur les échantillons ozonés. Ainsi, le traitement à l'ozone gazeux permet d'inhiber le développement des conidiophores.

Selon ces auteurs, l'efficacité du traitement sur la germination des spores de *B.cinerea* dépend du temps d'application ainsi que de la température. En effet, à 20 °C et après 48 heures d'exposition, le taux de germination est réduit de 99,5 % quelle que soit la concentration considérée. En revanche, 38,4 % des spores sont encore viables après 48 h lorsque la concentration de 450 ppb est appliquée à 5 °C. Selon les auteurs, la hausse de la température permettrait en effet d'augmenter la formation des radicaux libres et donc d'accroître l'efficacité du traitement. D'autre part, l'efficacité maximale n'est atteinte qu'après 48 heures d'exposition.

Ames et al. (2013) ont eux aussi vérifié l'importance du **temps d'application**. Ils ont appliqué de l'ozone gazeux concentré à hauteur de 150 nL d'ozone/L, à 2 °C, sur différentes espèces fongiques (appartenant aux genres *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium*). Après une exposition de 3 à 4 semaines, 50 % des conidies sont encore en mesure de germer tandis qu'après 8 à 12 semaines, seuls 5 % d'entre elles se développent. Des conclusions similaires ont été présentées par Minas et al. (2010) : la limitation du développement mycélien ainsi que de la germination des spores de *B.cinerea* est accrue par un allongement de la durée d'exposition. L'inhibition du mycélium atteint 51 % après 144 heures d'exposition. La limitation du taux de germination des spores est de l'ordre de 99 % après 72 heures au lieu de 1 % après deux heures d'exposition.

Ils précisent que dans le cas du mycélium, l'inhibition du développement disparaît peu à peu après l'arrêt de l'ozonation ce qui n'est pas le cas des spores puisque, même 72 heures après avoir été sorties de la chambre d'ozonation, les spores ne semblent pas être en mesure de germer. Ils en concluent que l'ozone a un effet létal sur les spores du pathogène. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Mylona et al. (2014) qui montrent que, si les spores de *Fusarium verticillioides* étaient complètement inhibées durant les 24 heures après l'application du traitement, la germination des spores reprend après 2 à 4 jours suivant l'arrêt du traitement et finit par atteindre 100 % au bout de huit jours sans ozone.

➤ Influence de la diversité de sensibilité et des modes d'application

Antony-Babu & Singleton (2009) ont soumis *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus ochraceus* à trois modalités d'exposition à l'ozone : une concentration de 0,2 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ appliquée pendant 12 jours et deux concentrations plus élevées de 200 et 300 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ appliquées durant 10 minutes. Les trois modalités retardent le développement des deux espèces fongiques mais pas avec la même sévérité. Une exposition continue à faible concentration permet de limiter l'inoculum initial tandis qu'un traitement intense sur une courte période tue les spores déjà présentes. Dans le cas des expositions courtes à fortes doses, la production de spores est identique à celle du témoin et n'est donc pas significativement réduite. En revanche, dans ces conditions, les spores présentes auront plus de difficultés à germer que lors d'une exposition continue à faible dose.

D'autre part, des différences de sensibilité peuvent être mises en évidence entre espèces. Palou et al. (2001) ont montré que la croissance radiale de *Penicillium italicum*, mesurée après cinq jours d'incubation, était réduite de façon significative par une exposition continue à 0,3 ppm à 5 °C pendant 4 jours. En revanche, *Penicillium digitatum* reste insensible aux mêmes conditions d'application. Selon ces auteurs, cette disparité d'activité pourrait s'expliquer par la morphologie des spores.

➤ Importance du stade de développement mycélien

La période d'application du traitement sur le champignon influence le niveau d'inhibition. Zotti et al. (2008) ont travaillé sur des espèces du genre *Aspergillus* : *A.niger* et *A.flavus*. Ces travaux présentaient notamment les variations de l'efficacité du traitement de 1 µg/mL d'ozone gazeux selon le stade de développement mycélien (colonies âgées de 3, 6 ou 9 jours). La première application durait 3 heures. Les deux suivantes, d'une heure, intervenaient tous les trois jours. Dans tous les cas, l'ozone limite le développement mycélien. Toutefois, l'inhibition est plus prononcée lorsque le mycélium est traité précocement. Lorsque la première application sur *A.flavus* était réalisée sur des colonies de 3 jours, l'inhibition de la croissance était totale. En revanche, sur du mycélium de 6 jours, le traitement ne réduisait que partiellement le développement mycélien. Les auteurs notent ici encore une différence de sensibilité entre les deux espèces : le développement mycélien d'*A.niger* est toujours inhibé quel que soit le jour d'application du premier traitement.

➤ Importance de l'humidité relative

Ozkan et al. (2011) ont démontré que l'augmentation de l'humidité lors de l'application de l'ozone gazeux sur champignons (*Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Botrytis cinerea*) accroît la vitesse d'inactivation des spores. Tuer 99 % des spores de *B.cinerea* lorsque l'humidité relative est de 95 % nécessite 702 µL.L⁻¹.h d'ozone. Ce même niveau d'inactivation demandera 1262 et 7713 µL.L⁻¹.h quand l'humidité relative est respectivement de 75 et 35 %.

ii. Effet de l'application d'eau chargée en ozone

L'application d'eau chargée en ozone *in vitro* sur spores fongiques est bien moins fréquente que l'application d'ozone gazeux. Le [Tableau 8](#) en fait un récapitulatif.

Conditions de traitements	Espèces ciblées	Paramètres <i>in vitro</i> évalués	Références
Mode d'application : eau préalablement chargée en ozone Concentrations : 0,1 ; 10 et 20 mg/L Température : 3 °C Durées d'application : 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30 et 60 minutes	<i>Aspergillus flavus</i>	Germination des spores	(Freitas-Silva et al., 2013)
Concentration : 0,188 mg/L Durée d'application : 5 minutes	<i>Aspergillus niger</i>	Germination des spores	(Restaino et al., 1995)

Tableau 8 : Publications utilisant de l'ozone dissous dans l'eau pour des tests *in vitro* sur espèces fongiques.

Freitas-Silva et al. (2013) ont appliqué de l'eau préalablement chargée en ozone sur des spores d'*Aspergillus flavus*. Les essais consistaient à submerger les spores dans 20 mL d'eau chargée en ozone, concentrée à la hauteur de 0, 1, 10 et 20 mg/L. La réaction était ensuite stoppée par l'ajout de formate de sodium au bout de 2,5 ; 5 ; 10 ; 30 et 60 minutes. Dans ces conditions d'application, plus la concentration en spores est importante, plus il est nécessaire d'accroître la quantité d'ozone appliquée pour inactiver la totalité des spores. Les auteurs ont également testé l'influence de la concentration en ozone et du temps d'exposition. Seule la concentration en ozone a montré une influence : le taux de germination était de 96 % en absence d'ozone et de 51 %, 7 % et 2 % respectivement pour 1, 10 et 20 mg/L d'ozone. En revanche, pour une même concentration appliquée, l'augmentation du temps d'exposition ne permettait pas d'améliorer l'efficacité du traitement. Selon les auteurs, l'effet de l'eau ozonée préalablement chargée est donc instantané quelle que soit la concentration en ozone considérée.

Restaino et al. (1995) ont appliqué de l'eau ozonée sur des spores d'*Aspergillus Niger* et deux espèces de levures. La viabilité des spores d'*A.niger* a été réduite de moins d'1 Log

au bout de 5 minutes alors que la réduction était de 4,5 Log après quelques secondes d'exposition pour les deux espèces de levures.

Au terme de ce paragraphe, il apparaît que l'effet anti-fongique de l'ozone a déjà été démontré. Toutefois, les traitements à base d'ozone contre les champignons ont jusqu'à présent majoritairement été réalisés à l'aide de la forme gazeuse de l'ozone. Dans l'optique d'envisager des applications sur cultures en verger, il était nécessaire de vérifier l'effet de l'eau ozonée sur des solutions de spores de *B.cinerea*, *V.inaequalis*, *N.alba* et *P.syringae*.

Compte-tenu du fait que cette demande n'a, à notre connaissance, jamais été publiée, en particulier sur *V.inaequalis*, *N.alba* et *P.syringae*, notre travail constitue une réelle innovation.

b- Mécanismes d'action sur les organismes biologiques

L'inactivation des micro-organismes par l'ozone est un processus complexe. L'ozone est en effet en mesure d'oxyder un grand nombre de constituants cellulaires dont les protéines et les lipides insaturés dans les membranes cellulaires ; les peptidoglycanes dans les enveloppes cellulaires de bactéries ou encore les acides nucléiques et enzymes dans le cytoplasme. L'ozone peut également altérer, dans les « manteaux » de spores et les capsides de virus, les protéines et peptidoglycanes. Pour certains auteurs, c'est l'ozone lui-même qui est le principal inactivateur tandis que d'autres estiment que ce sont les produits secondaires de la décomposition de l'ozone qui agissent ($^{\circ}\text{OH}$, $^{\circ}\text{O}_2^-$ et HO_3°) (Khadre et al., 2001).

Face à la complexité des processus engagés, il a été recensé les mécanismes et les structures cellulaires impliqués lors de l'inactivation des micro-organismes par l'ozone (Tableau 9). Les études, qui tentent d'expliquer les mécanismes et qui ont été menées jusqu'à présent, concernent majoritairement les bactéries ou leurs spores mais très peu s'intéressent aux champignons (Miller et al., 2013). C'est pourquoi, l'étude bibliographique de l'effet de l'ozone que nous proposons rend compte essentiellement des études réalisées sur bactéries.

Structures cellulaires	Articles						Reviews			
	[A]	[B]			[C]	[D]	[E]	[F]		[G]
Surface cellulaire en général	1	1			1	1		1	1	1
Oxydation des phospholipides de la surface cellulaire	1	Ozonation courte	Ozonation longue	Bilan	1			1	1	1
		2	2 ↗	1						
Perméabilité membranaire		1	1	1	1	1				
Protéines		1	1↗	1	1	1				1
Composés intracellulaires en général		Non affectée	3	2	2			2 (Lib éra tion)		2 (Libé ra tion)
Acides nucléiques	3	2 (libération)	↗ libération + destructio n (3)	2					2	
Protéines intracellulaires		3			2				2	
Noyau interne de la spore						2				non affec té
Enzyme									2	1
Mitochondries							1			
Mort cellulaire/ lyse cellulaire	2	Non affectée	↗	2	2	2 ou 3	2	2	3	2

Tableau 9 : Inventaire des structures cellulaires supposées touchées par l’ozone en fonction des publications. Les numéros présents dans les cases indiquent l’ordre dans lequel ces différents éléments seraient atteints.

[A] : (Scott & Leshner, 1962) ; [B] : (Komanapalli & Lau, 1996) ; [C] : (Cho et al., 2010) ; [D] : (Makky et al., 2011) ; [E] : (M. K. Ong & Ali, 2015) ; [F] : (Miller et al., 2013) ; [G] : (Khadre et al., 2001).

Une grande partie des auteurs s’accorde à dire que la première cible de l’ozone est la surface cellulaire. Ceci est corroboré par le fait que l’ozone est estimé comme étant trop réactif pour pénétrer profondément dans les tissus sans altération de la membrane cellulaire. Ainsi, seule une petite quantité peut traverser une membrane (Pryor, 1992).

En premier lieu, la perméabilité de la membrane est affectée (Miller et al., 2013). L'oxydation des phospholipides qui la constituent est impliquée. L'ozone, en entrant en contact avec les acides gras polyinsaturés, entraîne leur peroxydation ce qui modifie la fluidité de la membrane (Figure 17). Une réaction d'«ozonolyse» se produit conduisant au clivage par l'ozone des doubles liaisons des alcènes des chaînes polyinsaturées donnant des ozonides (mécanisme de Criegee). Ces derniers se décomposent ensuite en radicaux organiques, aldéhydes ou peroxydes (Iriti & Faoro, 2008) .

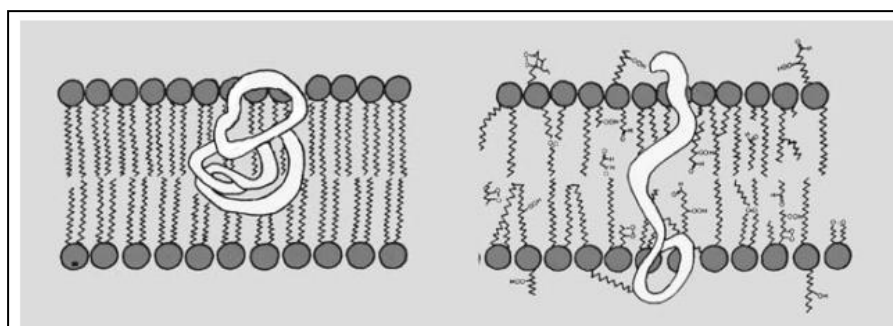


Figure 17 : Déstructuration de la membrane plasmique suite à la peroxydation des phospholipides membranaires par l'ozone (Iriti & Faoro, 2008)

Les protéines constituant la surface cellulaire seraient également oxydées (Komanapalli & Lau, 1996; Makky et al., 2011) et/ou libérées (Cho et al., 2010). Compte-tenu des rôles fonctionnels et structuraux des phospholipides et des protéines dans les membranes biologiques, leur altération pourrait conduire à la modification de la perméabilité membranaire (Komanapalli & Lau, 1996).

L'inactivation des enzymes serait également impliquée (M. Khadre et al., 2001), avec comme enzymes cibles :

- la déhydrogenase, impliquée dans le système respiratoire
- l'α-galactosidase cytoplasmique
- voire (mais en moindre mesure) la phosphatase périplasmique alcaline.

Selon Khadre et al. (2001), une fois que l'ozone a oxydé les doubles liaisons des chaînes lipidiques et certains groupements sulfhydriles (-SH) des enzymes, il s'ensuit la perturbation de l'activité normale de la cellule, induite par l'altération de la perméabilité de la membrane, puis la mort cellulaire.

Dave (1999), en microscopie électronique, confirme que l'eau enrichie en ozone entraînerait des modifications importantes des membranes (Figure 18).

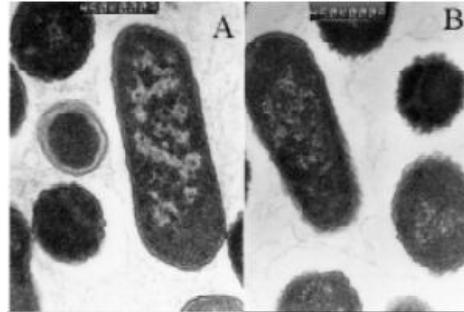


Figure 18 : Photographies de *Salmonella enteridis* (A) avant ozonation et (B) après ozonation mettant en évidence l'altération de la membrane (Dave, 1999)

Dans un second temps ou en conséquence des altérations de la membrane, les composés intracellulaires seraient atteints. Selon Scott & Lesher (1962), l'ozone attaque la structure primaire des acides nucléiques ou leurs produits de décomposition seulement après leur libération dans le milieu suite à des pertes ou à la lyse de la cellule. Le fait que l'ozone ne pénètre pas dans la cellule est prouvé également par son incapacité à oxyder les SH- des glutathions contenus dans les cellules (même aux plus hautes doses d'ozone). Pour les auteurs, la perte des protéines et des acides nucléiques s'explique par le fait que le lieu d'activité primaire de l'ozone est la surface cellulaire des bactéries. L'ozone réagit ensuite avec les acides nucléiques présents dans le milieu en s'attaquant préférentiellement aux bases pyrimidines (la thymine étant la cible la plus facile par rapport à la cytosine ou à l'uracile).

Enfin, un travail récent sur les spores fongiques propose une seconde version. Selon Ong & Ali (2015), l'ozone entrerait dans la cellule et endommagerait les mitochondries. La mitochondrie répondrait à ce stress oxydatif par la production de ROS. L'accumulation de ROS entraînerait à son tour l'oxydation des mitochondries aboutissant à la destruction cytoplasmique et à la plasmolyse.

La connaissance des mécanismes d'action de l'ozone induisant la mort cellulaire est encore imprécise. L'hypothèse de l'altération de la membrane cellulaire semble dominer. Dans le cas des spores fongiques, notre travail s'axera sur la vérification de cette hypothèse.

2) Applications de l'ozone *in vivo*

a- Traitement à l'ozone en pré-récolte

➤ **Application d'ozone dans l'atmosphère**

Afin de limiter la pression microbienne sur des végétaux produits en milieu fermé (serre), Park et al. (2008) ont testé l'application d'un brouillard froid d'eau chargée en ozone. Trois séries d'une demi-heure de traitement étaient réalisées dans une journée. Les traitements consistaient en une succession de vaporisations d'eau chargée en ozone à 10 mg/L. La concentration en ozone gazeux dans la serre n'excéda jamais 0,04 mg/L et n'a donc jamais atteint les niveaux dangereux (0,05 mg/L pendant 8 heures de travail). Bien qu'une légère baisse du nombre de bactéries et de champignons ait été signalée, les densités de populations microbiennes n'étaient pas significativement différentes entre les plantes de la serre témoin et celles de la serre où le brouillard ozoné avait été diffusé. Les auteurs suggèrent des essais supplémentaires qui permettraient d'optimiser le traitement en appliquant le brouillard plusieurs jours ou en augmentant les périodes d'application.

La question de la phytotoxicité de l'eau chargée en ozone a été abordée dans plusieurs études. Aucune phytotoxicité n'a été signalée lors de l'application par spray d'eau chargée en ozone concentrée à la hauteur de 4 et 8 mg/L (trois applications par jour pendant trois jours consécutifs) sur plantules de melons, tomates, pastèques, concombres, poivrons et aubergines (Fujiwara et al., 2011).

Pourtant, Graham et al. (2009) ont constaté des signes de phytotoxicité sur plantes ligneuses après plusieurs semaines de traitement pour des concentrations plus faibles en ozone. Dans leur étude, l'eau d'irrigation recyclée de pépinières était préalablement chargée à différentes concentrations d'ozone puis était pulvérisée sur les feuilles. Des symptômes de phytotoxicité sont apparus après 6 semaines de traitement avec une eau chargée en ozone contenant des concentrations en ozone dissous supérieures ou égales à 0,9 mg/L (blessures

des feuilles, réduction des surfaces foliaires, du poids des pousses, de la hauteur des pousses et du poids sec des racines). Les symptômes sur les feuilles nouvellement formées restaient toutefois faibles. Aucune phytotoxicité n'a été visible à des doses réduites (inférieures ou égales à 0,5 mg/L).

➤ **Désinfection de l'eau d'irrigation**

Un grand nombre de pathogènes a été identifié dans les eaux d'irrigation. Les doses efficaces d'ozone varient selon les micro-organismes visés : les doses minimales pour contrôler les bactéries, champignons, oomycètes et virus sont de 0,5 ; 0,7 ; 0,8 et 7,9 mg/L d'ozone avec un temps de contact de 1, 16, 8, et 75 min, respectivement (Raudales et al., 2014). En culture hydroponique, le microbullage comparativement au bullage classique permet d'améliorer les performances anti-microbiennes du traitement (Kobayashi et al., 2011). Selon Graham et al. (2009), le seuil à partir duquel l'eau chargée en ozone pulvérisée engendre une phytotoxicité sur les plants est suffisamment élevé pour permettre le contrôle des algues et agents responsables des biofilms dans les systèmes d'irrigation. D'après ces auteurs, l'eau ozonée constitue une solution efficace pour contrôler les pathogènes présents dans l'eau et peut s'inscrire dans la gestion de l'irrigation.

➤ **Application d'eau ozonée au champ**

Des outils permettant l'emploi de l'eau chargée en ozone en champs ont vu le jour. C'est notamment le cas du procédé PhytO3 (Steffen & Rice, 2008b) qui met en œuvre trois traitements appliqués quasi-simultanément : eau électrolysée, eau ozonée et UV. Des résultats montrant son efficacité pour le traitement de culture de céréales (blé, maïs) et de légumes (tomate brocolis,...) ont été publiés (Steffen & Rice, 2008a). Ce traitement appliqué 5 à 10 fois lors de la saison de culture se substitue aux traitements phytosanitaires classiques et permet l'obtention de produits de qualités sanitaires équivalentes à ceux obtenus avec les méthodes classiques. Il n'a pas d'effet négatif sur les cultures, élimine l'utilisation et la présence de produits phytosanitaires résiduels pour un coût moins élevé que les traitements classiques. Cette technologie a été testée avec succès lors d'une campagne de culture de soja sur 2 700 ha au Brésil. Elle a permis d'éliminer les traitements pesticides et insecticides pour produire un soja qualifié de bio avec une valeur marchande plus élevée.

➤ Limitation de la désorption de l’ozone

La pulvérisation d’eau chargée en ozone demande une certaine technicité. Graham et al. (2009) ont mis en évidence que des pertes d’ozone étaient générées par la pulvérisation elle-même. Quelle que soit la concentration initiale en ozone dissous de l’eau ozonée, les pertes d’ozone constatées à environ 50 cm des buses de pulvérisation sont estimées à 70 %.

La surpression et l’ajout d’air entraînent la désorption de l’ozone. Tout ajout d’air doit être fait à basse pression. Pour limiter la désorption de l’ozone, la pression de la conduite d’eau chargée en ozone doit être maintenue en dessous de 19 Psi (soit 1,3 bars). Sands et al. (2004) conseillent de ne pas utiliser de ventilateur d’air pour pousser le liquide. Cela permet de diminuer la désorption de l’ozone. L’eau chargée en ozone est alors délivrée sous forme de courant ou de gouttelettes issues directement de buses à liquide.

La taille des gouttelettes ainsi que la distance entre la buse de pulvérisation et la cible ont également leur importance. Fujiwara & Fujii (2004) ont testé l’influence de ces deux paramètres. Plusieurs mesures ont été réalisées tout au long du parcours du jet d’eau (de 5 à 75 cm par rapport à la sortie de la buse). Ils constatent que plus les gouttes sont fines, plus les pertes en ozone sont importantes. Pour une concentration initiale de 2,2 mg/L, une gouttelette dont le diamètre est de 0,576 mm sera concentrée à hauteur de 0,7 mg/L (soit 68 % de désorption) après avoir parcouru 5 cm alors qu’une gouttelette de 0,187 mm de diamètre aura une concentration de 0,42 mg/L environ (soit 81 % de désorption) pour cette même distance. Les pertes sont d’autant plus importantes que la distance entre pulvérisateur et surface-cible est élevée. Ainsi, la concentration d’une gouttelette de 0,576 mm de diamètre sera de 0,7 mg/L (soit 68 % de désorption) à 5 cm et de 0,18 mg/L (soit 92 % de désorption) après 75 cm de parcours.

b- Traitement à l’ozone en post-récolte

En industrie agro-alimentaire, les principaux agents désinfectants actuellement utilisés sont rémanents. Le plus courant est le chlore. Face à sa dangerosité et sa toxicité pour l’environnement, l’ozone, sous sa forme gazeuse ou liquide, pourrait être une alternative. Une étude a permis de comparer l’efficacité de l’eau ozonée, chargée à 0,5 ppm et appliquée pendant 10 minutes, à celle du chlore (Greene, Few, & Serafini, 1993). Dans les deux cas, les traitements ont réduit la charge en bactéries de 99 %, bactéries localisées sur

des plaques d'acier inoxydables et responsables de biofilms altérant le lait. Par ailleurs, si le coût d'investissement est plus élevé que pour le chlore (Pascual et al., 2007), une étude menée par Rice et al. (2002) a mis en évidence que l'utilisation d'une unité mobile d'ozonation permettait de diviser par trois le coût annuel de désinfection dans l'industrie agro-alimentaire étudiée. Le coût de fonctionnement d'un ozoneur reste effectivement faible et la méthode permet de réaliser des économies en eau et énergie.

i. Impact de la matrice et du milieu à traiter

Selon Miller et al. (2013), le paramètre majeur dont dépend l'efficacité de l'ozone est le type de produit traité. Les surfaces lisses et uniformes sont plus aisées à désinfecter par l'ozone que les surfaces rugueuses et irrégulières, favorables à la présence de niches inatteignables renfermant les micro-organismes. Alexopoulos et al. (2013) ont montré que la réduction des coliformes s'élève à 3 Log dès 7 minutes de trempage dans de l'eau continuellement ozonée (0,5 mg/L) dans le cas des poivrons dont la surface est quasiment lisse tandis qu'il faut attendre 15 minutes pour réduire de 2,2 Log la charge en coliformes des laitues.

Le type de matière organique présente dans la solution à ozoner influence également l'efficacité du traitement. Restaino et al. (1995) ont étudié l'influence de l'addition dans l'eau de deux substances différentes : l'amidon soluble et l'Albumine Bovine (BSA). En présence d'amidon, le taux de mortalité des bactéries n'est pas modifié lors du traitement à l'ozone. En revanche, l'efficacité du traitement est réduite en présence de BSA, consommatrice d'ozone. Le suivi des quantités d'ozone résiduel montrait que la concentration en ozone chutait en présence de BSA passant de 0,188 ppm (eau ozonée sans additif) à 0,149 ppm tandis qu'aucune diminution significative n'avait été enregistrée lors de l'addition d'amidon.

ii. Traitements sur pommes

De nombreuses études ont été menées sur la décontamination des surfaces de fruits et de légumes soit par ozone gazeux soit dans de l'eau ozonée. Le [Tableau 10](#) présente le travail d'inventaire des publications de traitements à base d'ozone réalisé par Miller et al. (2013) : seules les études faites sur pommes sont proposées.

Forme de l'ozone	Conditions de traitements	Paramètres évalués	Résultats	Références
Ozone gazeux	Exposition à 450 ppb d'ozone pendant 48h	- <i>Botrytis cinerea</i> - Couleur - Fluorescence - Texture	La taille des lésions a été réduite sur les fruits traités. L'ozone n'a pas d'effet significatif sur la couleur ou la fluorescence	(Sharpe et al., 2009)
Eau ozonée	Immersion dans l'eau contenant de l'ozone (3 ppm) pendant 5 minutes, puis stockage à 4°C pendant 9 jours.	- <i>E.coli O157:H7</i> - <i>L. monocytogenes</i> - AMB - Levures/champignons	L'ozone est efficace pour inactiver <i>E.coli O157:H7</i> et <i>L. monocytogenes</i> . Pendant le stockage, les populations des deux pathogènes resteront relativement inchangées tandis que le nombre d'AMB et de levures/champignons augmenteront	(Rodgers et al., 2004)
	Bullage de l'ozone pendant le lavage des pommes et trempage des pommes dans de l'eau pré-ozonée	- <i>E.coli O157:H7</i>	Le bullage de l'ozone est plus efficace que l'application d'eau préalablement chargée en ozone.	(Achen & Yousef, 2001)
	Traitements des pommes entières dans de l'eau ozonée dans un prototype de paillasse conçu par les auteurs	- <i>E.coli O157:H7</i>	La réduction maximale de 2,9 Log CFU a été obtenue sur la surface des pommes	(Klingman and Christy, 2000)
	Lavage dans de l'eau contenant de l'ozone (0,25 ppm) pendant 30 minutes	- Pesticides	Tremper dans de l'eau ozonée entraîne la réduction des niveaux de pesticides sur les surfaces des pommes	(Ong et al., 1996)

Tableau 10 : Inventaire des publications appliquant de l'ozone sur pommes réalisé par Miller et al. (2013)

Achen & Yousef (2001) ont par exemple évalué l'efficacité de traitements à base d'ozone sur des pommes préalablement inoculées avec *E.coli*. Faire buller de l'ozone est plus efficace que de tremper les pommes dans des eaux préalablement chargées en ozone (les comptages d'*E.coli O157:H7* diminuent de 3,7 et 2,6 Log CFU, respectivement sur la surface des pommes). L'ajout de mouillant (tetrasodium pyrophosphate) permet également d'améliorer les performances du traitement.

Tout comme Sharpe et al. (2009), Minas et al. (2010) ont testé l'effet de l'enrichissement en ozone gazeux de l'atmosphère d'une chambre de stockage

conventionnelle contre *Botrytis cinerea*. Après 8 heures d'exposition à 450 ppb, la capacité de germination de ce champignon était significativement réduite.

Si l'ozone diminue drastiquement les maladies dont l'inoculum est en surface, il n'atteint pas les champignons inoculés dans les blessures avant le traitement (Smilanick et al., 2002).

L'ozone aurait également une action sur les mycotoxines et plus précisément sur la patuline retrouvée dans le jus de pommes et connue pour ses propriétés cancérigènes (Tiwari & Muthukumarappan, 2012). Pour autant, l'application d'ozone peut entraîner l'altération de certains critères de qualité comme la couleur, les propriétés rhéologiques de surface ou encore le contenu phénolique (Torres et al., 2011). Dans le cas où les doses d'ozone sont excessives, l'ozone peut entraîner le développement d'odeurs (Khadre et al., 2001).

Des solutions pour éliminer les résidus de pesticides couramment trouvés sur fruits, légumes ou grains sont à l'étude (Miller et al., 2013). Le trempage de pommes dans de l'eau chargée en ozone, à des concentrations appropriées, permettrait de réduire la quantité de pesticides présents en surface (Ong et al., 1996). Toutefois, la destruction n'est jamais complète et les pesticides au contact de l'ozone donnent naissance à des sous-produits, potentiellement toxiques (Ikehata et al., 2006).

En synthèse, ces études mettent clairement en évidence que les multiples facteurs impliqués et la diversité des agents microbiens imposent de vérifier l'efficacité de l'ozone pour chaque situation.

III- L’ozone, un agent anti-fongique contre les principaux pathogènes du pommier ?

Compte-tenu des attentes environnementales et sanitaires des acteurs de la filière pomme, trouver une alternative aux produits phytosanitaires, limitant le développement fongique des principales maladies du pommier et ayant un faible impact sur l’environnement, revêt un grand intérêt. L’ozone, de par ses propriétés physico-chimiques, possède un pouvoir oxydant et une forte réactivité qui en font un agent désinfectant prometteur. Par ailleurs, il présente une faible rémanence. Partant de ces différents constats, l’objectif de la présente thèse est d’étudier la possibilité d’utiliser l’ozone comme moyen de lutte en verger contre quatre maladies fongiques du pommier : *V.inaequalis*, *B.cinerea*, *N.alba* et *P.syringae* (Figure 19). Très peu d’applications d’eau chargée en ozone en champs ont été répertoriées dans la littérature et aucune ne concerne ces quatre espèces fongiques. Avant d’envisager un transfert au verger, il était donc nécessaire de vérifier l’effet anti-fongique de l’ozone contre ces micro-organismes, d’acquérir des données sur le mode d’action de l’ozone et de mieux appréhender les paramètres de traitement et leur importance.

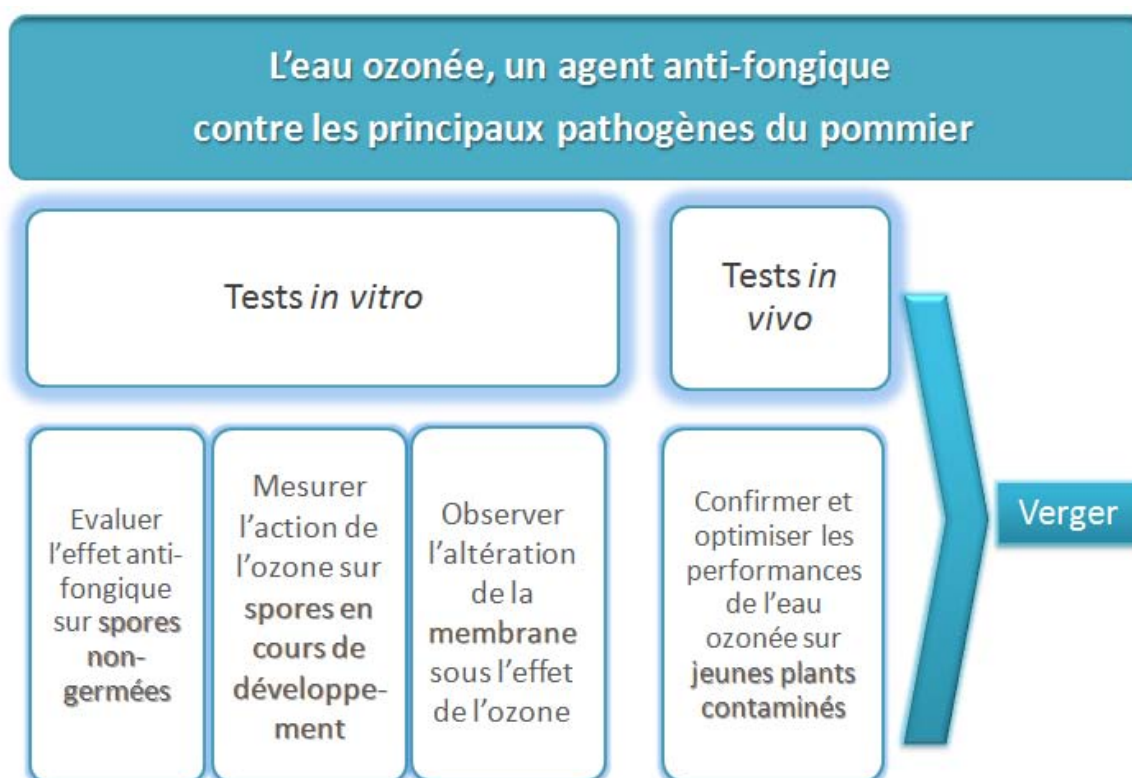


Figure 19 : Démarche générale des travaux de thèse

D'après l'étude bibliographique, il a déjà été démontré l'efficacité de l'eau chargée en ozone contre les champignons. Il est donc possible de faire l'hypothèse que l'ozone sera également efficace contre les spores de *V.inaequalis*, *B.cinerea*, *N.alba* et *P.syringae*. Pourtant, les données bibliographiques mettent en évidence une hétérogénéité des résultats en fonction de l'espèce considérée, du stade de développement, des doses, des modes d'application de l'ozone, ... Cette hétérogénéité impose donc de vérifier l'action de l'ozone sur chaque espèce-cible. L'ozone sera appliqué par bullage ou par ajout d'eau préalablement chargée en ozone dans les suspensions de spores non-germées des quatre espèces fongiformes. Il s'agira de s'assurer de l'action anti-fongique de l'ozone quelle que soit l'espèce considérée, d'évaluer la sensibilité des différentes espèces ainsi que d'appréhender les paramètres impliqués et les doses minimales efficaces. L'action anti-fongique de l'eau chargée en ozone sera également évaluée sur différents stades de développement des spores d'un des champignons-cibles de l'étude, *V.inaequalis*. Les essais sur spores en développement permettront également d'appliquer l'eau chargée en ozone dans un environnement plus complexe.

Par ailleurs, selon les données bibliographiques, la première cible de l'ozone serait la surface cellulaire du micro-organisme. Un volet de l'étude sera donc consacré à la validation de l'hypothèse de la dégradation de la membrane cellulaire des spores sous l'action de l'ozone.

Enfin, dans le but de se rapprocher des conditions réelles, l'efficacité de l'eau chargée en ozone sera vérifiée sur jeunes plants de pommiers contaminés par des spores de *V.inaequalis*. Ces essais d'eau chargée en ozone en conditions contrôlées permettront d'examiner les paramètres du traitement déterminants et de valider la candidature de l'eau chargée en ozone comme solution anti-fongique alternative aux produits phytosanitaires utilisés en verger.

Chapitre 2 :

Matériels et Méthodes

Dans ce chapitre, il sera développé l'ensemble des techniques mises en œuvre durant ce travail de thèse. Il sera tout d'abord présenté les méthodes de production du matériel fongique et d'obtention des suspensions de spores. Dans un second temps, il sera exposé les protocoles mis au point, en partant de l'application d'ozone sur spores en suspensions jusqu'au traitement à l'aide d'eau chargée en ozone de jeunes plants contaminés.

I- Obtention de suspensions de spores fongiques

A- *Venturia inaequalis*

Les conidies ont été multipliées en s'appuyant sur la méthode développée par l'équipe PaVé de l'INRA d'Angers. Des feuilles de cellophane qui constituent le support de conservation sont autoclavées puis déposées sur boîtes de Pétri contenant du Malt Extract Agar (MEA). Deux cents microlitres de solutions de spores (souche 2413, prélevée sur pommes Gala en France en 2006) sont déposés sur la feuille de cellophane. Les boîtes sont ensuite incubées en chambre de culture à 17 °C et à la lumière (éclairage 16 heures/jour). Après 7 à 10 jours d'incubation, les feuilles de cellophane sont retirées des boîtes et séchées. Elles sont conservées dans des tubes stériles remplis de billes de silica gel qui maintiennent un niveau d'humidité faible durant toute la durée de stockage. Un coton stérilisé est introduit entre cellophane et billes de silica gel pour éviter tout contact. Les supports de conservation peuvent ainsi être stockés à -20 °C pendant plusieurs mois.

La suspension de spores est obtenue en plongeant un support de conservation (feuille de cellophane) portant les conidies dans de l'eau préalablement autoclavée. Un support porte entre un et trois millions de spores. Le nombre de supports de conservation ajoutés dans l'eau est calculé selon la concentration finale souhaitée. A l'aide de comptages sur cellules de Malassez, cette concentration est vérifiée et si nécessaire ajustée.

B- *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea (souche CBS 126.58, isolée sur fruit au Pays-Bas en mars 1957) est cultivé à 21 °C sur Potato Dextrose Agar (PDA). Les suspensions de spores sont réalisées à

partir de cultures âgées de trois semaines au moins. Des fragments de gélose portant du mycélium sont placés dans de l'eau distillée et stérilisée puis fortement agités au vortex. Cette opération est répétée jusqu'à obtenir la concentration souhaitée, contrôlée par comptage sur cellules de Malassez. Les fragments de gélose sont ensuite éliminés par transvasement avant une dernière vérification de la concentration finale sur cellules de Malassez.

C- *Neofabraea alba*

Cette espèce ne fructifie pas *in vitro* et se développe particulièrement lentement. C'est la raison pour laquelle, les spores ont été prélevées directement sur pommes contaminées ayant passé 6 à 8 mois en chambre froide de stockage. Les pycnides, structures-mère renfermant les spores, sont extraites (Figure 20).

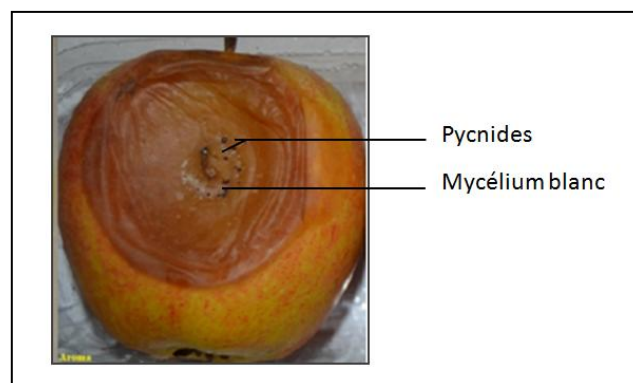


Figure 20 : Pomme atteinte par *N.alba*, portant du mycélium blanc ainsi que les pycnides du champignon.

Ces structures sont ensuite placées dans des tubes eppendorfs (4 à 6 par eppendorf) contenant de l'eau stérile. A l'aide d'une tige plastique à embout conique épousant parfaitement la forme conique des éppendorf de 1,5 mL, les pycnides sont écrasées contre la paroi libérant ainsi leur contenu. Les suspensions obtenues sont ensuite conservées à -20 °C. Après une phase de décongélation, la concentration est vérifiée sur cellules de Malassez et ajustée par ajout de solutions de spores ou dilutions jusqu'à atteindre la concentration voulue.

D- *Phytophthora syringae*

Phytophthora syringae est cultivée à 21° C sur boîtes de Pétri de milieu PDA provenant d'une souche commerciale (CBS 133.616, provenant des Pays-Bas). Les solutions de conidies sont préparées à partir de cultures âgées d'environ un mois. Des fragments de mycélium provenant du grattage de la surface des cultures sont mélangés à de l'eau déminéralisée stérile. Cette solution est ensuite filtrée afin d'éliminer les fragments de mycélium et de milieu gélosé. Après trois heures d'incubation à -4 °C pour la génération de zoospores, les solutions sont concentrées par centrifugation (à 4000 G, pendant 10 min et à 4°C) et laissées une demi-heure à température ambiante pour la germination des cysts. Ce protocole permet de produire les suspensions de spores ou oospores de *Phytophthora syringae*.

II- Evaluation de l'action de l'ozone sur spores *in vitro*

A- Mise en œuvre de l'ozonation de suspensions de spores

Dans l'objectif de vérifier l'effet de l'ozone sur la viabilité des spores de différentes espèces fongiques ainsi que pour déterminer les doses minimales d'efficacité, les suspensions de spores subissent un traitement à base d'ozone soit par bullage de l'ozone directement dans les suspensions de spores soit par addition d'eau préalablement chargée en ozone. La mesure du taux de germination permet d'évaluer l'action de l'ozone. Les techniques d'ozonation ont différé selon la concentration en spores produite. Pour *V.inaequalis*, *B.cinerea* et *N.alba* pour lesquelles la concentration était de l'ordre de 1.10^5 spores/mL, l'ozone a été directement appliqué par bullage dans les suspensions de spores. Pour *P.syringae* dont la suspension était faiblement concentrée (environ 1.10^2 spores/mL), de l'eau déminéralisée et stérilisée était ozonée avant d'être appliquée sur la suspension de spores.

1) Application de l’ozone

a- Procédé de traitement utilisé

Le procédé d’ozonation utilisé pour les tests *in vitro* comporte un ozoneur de type LAB2B2 (Ozonias, Dubendorf, Switzerland) délivrant des décharges Corona pour transformer le dioxygène en ozone (Figure 21).

Il peut être alimenté en dioxygène ou en air synthétique (mélange d’azote et de dioxygène de l’ordre de 78,09/20,94 % vol). L’alimentation en dioxygène permet d’augmenter les quantités d’ozone produites. C’est la raison pour laquelle, pour des concentrations inférieures à 10 mg/L, l’utilisation de l’air est suffisante tandis que pour atteindre des concentrations supérieures, l’alimentation en dioxygène est nécessaire. Le gaz ainsi produit est analysé à l’aide d’un analyseur BMT 961 (BMT, Berlin, Germany) afin d’en connaître la concentration en ozone (exprimée en g.m^{-3}).

L’ozone pénètre ensuite dans la colonne de bullage de 20 mL. Cette colonne est constituée d’un tube de verre (20 mm de diamètre) disposant d’une entrée et d’une sortie aux extrémités, ainsi que d’un fritté en cloison intermédiaire (Figure 20). Le fritté permet d’obtenir des bulles de petites tailles, taille qui favorise le transfert de l’ozone dans le liquide se trouvant dans la partie supérieure de la colonne du réacteur. L’excédent d’ozone est ensuite évacué par la partie supérieure du tube et est analysé avec un second analyseur, identique au premier. Il est enfin détruit par une solution d’iodure de potassium (concentrée à la hauteur de 50 g/L).

Dans le cas de *V.inaequalis*, *B.cinerea* et *N.alba*, dix millilitres de suspensions de spores concentrés à environ 1.10^5 spores/mL sont placés dans la partie supérieure du réacteur. Concernant *P.syringae*, le réacteur est utilisé pour charger 10 mL d’eau en ozone avant de les appliquer sur la suspension de spores.

Par praticité, l’eau chargée en ozone pourra être nommée « eau ozonée » dans la suite du manuscrit.

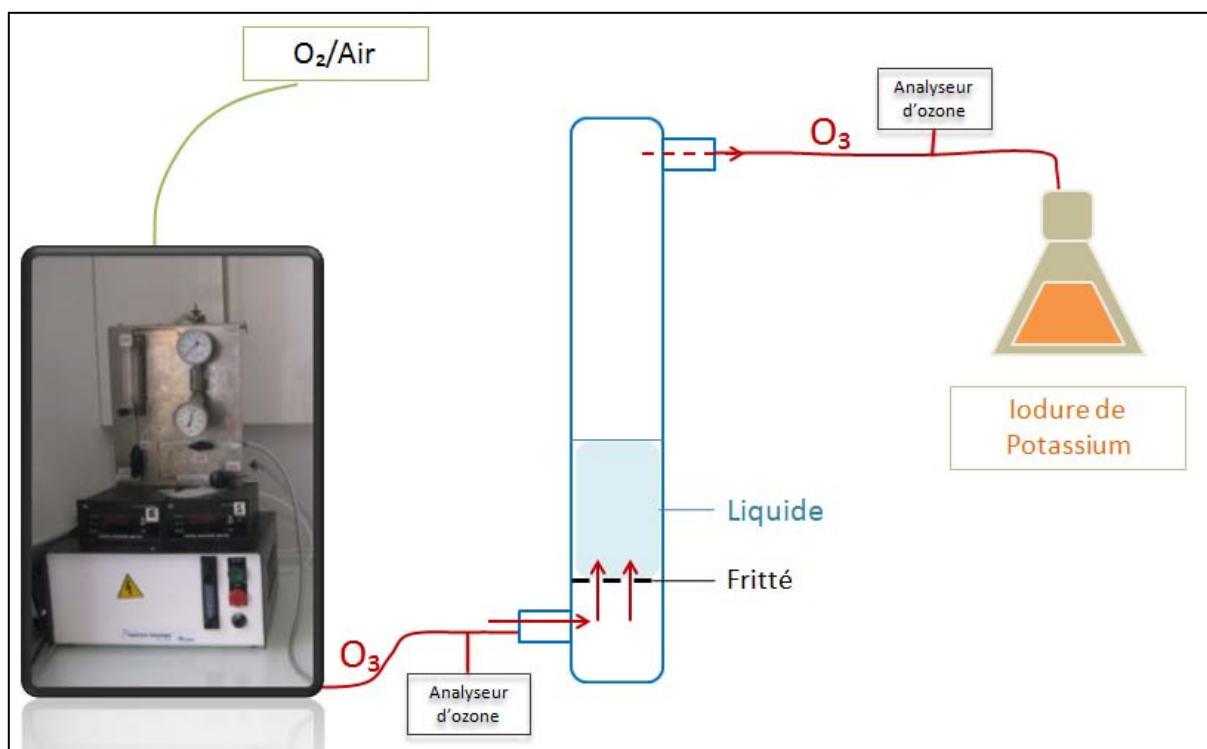


Figure 21 : Procédé d'ozonation comportant une colonne de bullage de 20 mL

b- Concentrations en ozone et durées d'application

i. **Cas du bullage de l'ozone directement dans la suspension de spores**

Dans le cas de *V.inaequalis*, *B.cinerea* et *N.alba*, l'ozone est appliqué par bullage directement dans les suspensions de spores. Plusieurs combinaisons de temps de contact entre spores et ozone ainsi que de concentrations sont testées. Ces différentes modalités conduisent à la définition de doses d'ozone en gaz appliquées dans les solutions, qui peuvent être estimées en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Dose d'ozone appliquée} = \frac{[O_3]_g \times D \times Q_v}{60 \times V} \quad (12)$$

où $[O_3]_g$ est la concentration d'ozone dans le gaz entrant dans le réacteur en mg.L^{-1} , D est la durée d'application de l'ozone en minute, V est le volume de la solution (ici 10 mL) et Q_v est le débit en L.h^{-1} . La dose d'ozone est exprimée en mg.mL^{-1} . Le [Tableau 11](#) présente les différentes modalités appliquées ainsi que les doses d'ozone correspondantes :

	Modalité	Concentration en ozone dans le gaz entrant (g.m ⁻³)	Durée du bullage (min)	Dose d'ozone appliquée (mg.mL ⁻¹)
Modalités hautes concentrations	0a	0,0	0,0	0,0
	0b	0,0	2,0	0,0
	0c	0,0	4,0	0,0
	1	10,0	0,5	0,08
	2	20,0	0,5	0,2
	3	30,0	0,5	0,3
	4	10,0	2,0	0,3
	5	20,0	2,0	0,7
	6	30,0	2,0	1,0
	7	20,0	5,0	1,7
Modalités basses concentrations	8	1,0	0,5	0,01
	9	1,0	2,0	0,03
	10	1,0	4,0	0,07
	11	2,0	0,5	0,02
	12	2,0	2,0	0,07
	13	2,0	4,0	0,1
	14	2,0	5,0	0,2

Tableau 11 : Modalités appliquées par bullage sur suspensions de spores

Dans le but de travailler avec des doses réalistes pour un éventuel passage en conditions *in vivo*, les concentrations choisies sont faibles et aisément atteignables pour un ozoneur de terrain. Toujours dans cette même optique, le temps de bullage est réduit. Les choix ont été réalisés en s'appuyant sur les acquis du laboratoire ainsi que sur des références bibliographiques (Freitas-Silva et al., 2013).

ii. Cas de l'addition d'eau chargée en ozone sur suspensions de spores

Toujours à l'aide du procédé d'ozonation présenté précédemment, de l'eau chargée en ozone est produite. Pour ce faire, l'ozone gazeux concentré à la hauteur de 35 g.m⁻³ bulle dans 10 mL d'eau stérile déminéralisée sans spore jusqu'à saturation. En considérant la Loi d'Henry (rappelée dans le chapitre 1), la concentration en ozone dissous sera estimée à environ 7,9 mg/L à la température de 20°C (constante d'Henry H_e calculée égale à 5524,7 atm/fraction molaire). L'eau ainsi chargée en ozone est ensuite ajoutée par pipetage

directement dans des volumes différents de suspensions de spores. Cet ajout est réalisé dans les minutes qui suivent l'arrêt du bullage afin de palier l'auto-décomposition rapide de l'ozone. Les doses appliquées sont présentées dans le [Tableau 12](#).

Modalités	Solutions de spores (en μL)	Eau stérile non-ozonée (en μL)	Eau chargée en ozone (en μL)	Volume total (en μL)	Doses d'ozone dissous (en mg/mL)
a	100	900	0	1000	0,00E+00
b	100	800	100	1000	7,88E-04
c	100	700	200	1000	1,58E-03
d	100	575	325	1000	2,56E-03
e	100	450	450	1000	3,55E-03
f	100	200	700	1000	5,52E-03
g	100	0	900	1000	7,09E-03

Tableau 12 : Modalités appliquées par addition d'eau préalablement chargée en ozone sur les suspensions de spores de *P.syringae*.

Les suspensions de spores ozonées sont ensuite laissées 45 minutes dans la glace puis 100 μL sont déposés sur milieu gélosé. Les trois répétitions réalisées par modalité sont stockées en chambre de culture à 18°C et observées après 7 jours.

Cette méthode a été utilisée pour *P.syringae* car les concentrations en spores obtenues étaient trop faibles pour atteindre 1.10^5 spores/mL.

2) Mesure du taux de germination

i. Suivi sur cellules de Malassez

Pour les suspensions de spores de *V.inaequalis*, *B.cinerea* et *N.alba*, la mesure du taux de germination est réalisée sur cellules de Malassez. Vingt microlitres de suspension de spores sont déposés par cellule. Les cellules sont ensuite placées dans une enceinte à haut pourcentage d'humidité (au moins 90 %), elle-même maintenue en chambre de culture dans les conditions favorables au développement du champignon ciblé ([Tableau 13](#)).

	<i>V.inaequalis</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>N.alba</i>
Température	17 °C	21 °C	23 °C
Temps en chambre de culture	24 heures	48 heures	24 heures

Tableau 13 : Conditions de culture de *V.inaequalis*, *B.cinerea* et *N.alba* après dépôt sur cellule de Malassez.

Après une période d'incubation variant entre 24 et 48 heures selon l'espèce, le taux de germination est évalué par observation sous Microscope Optique (Leica DM750 light microscope, Leica Microsystems GmbH, Germany). Cents spores sont choisies aléatoirement parmi lesquelles sont dénombrées les spores germées. Le **Tableau 14** présente les critères de comptage. Quatre comptages sont effectués par modalité. Chaque modalité a été répétée deux fois.




	<i>V.inaequalis</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>N.alba</i>
Taille spore (moyenne) - longueur - largeur	12-22 µm 6-12 µm	6-18 µm 4-11 µm	15-18 µm 1 à 3 µm
Longueur du Tube germinatif des spores germées	Quand le tube germinatif fait 2 fois la longueur de la spore non-germée	Quand le tube germinatif est supérieur à 3 µm	Quand la longueur du tube germinatif est égale à au moins la moitié de la longueur de la spore
Observations des spores (Microscope Optique)			

Tableau 14 : Critères de décision pour la mesure du taux de germination de *V.inaequalis*, *B.cinerea* et *N.alba* après dépôt sur cellule de Malassez.

Enfin, les paramètres concentration et durée d'application pouvant être représentés dans un plan orthonormé comme le plan d'expérience factoriel à deux facteurs, nous avons

pu établir l'équation de la réponse du taux de germination suivant ces deux facteurs. Le facteur X1 correspond au paramètre « Concentration en ozone » tandis que le facteur X2 est le paramètre « Durée d'application », ces facteurs étant dans les modèles sous forme centrées réduites.

A l'aide des équations obtenues, il a été réalisé une représentation graphique afin de mettre en évidence les tendances sur le domaine expérimental allant de 1 à 2 g.m⁻³ et de 0 à 4 minutes. Le choix s'est porté sur cette fenêtre de durées d'application et de concentrations car des variations importantes du taux de germination y étaient mesurées.

ii. Suivi sur milieu gélosé

Précisons que pour faire un suivi à long terme et également pour *P.syringae* dont la concentration en spores était trop faible (environ 1 à 3.10² spores.mL⁻¹), certaines solutions de spores témoins et traitées ont été déposées sur milieu gélosé. Les spores de *V.inaequalis* étaient inoculées sur MEA tandis que celles de *B.cinerea* et *P.syringae* étaient déposées sur PDA. Les boîtes étaient ensuite stockées avant observation dans la chambre de culture dans les conditions optimales de développement de l'espèce concernée.

B- Evaluation de la dégradation de la membrane cellulaire des spores fongiques sous l'effet de l'ozone

Comme cela a été abordé dans la synthèse bibliographique, la majorité des auteurs, qui ont principalement travaillé sur espèces bactériennes, s'accorde à dire que la première cible de l'ozone est la membrane cellulaire. La surface cellulaire des spores fongiques qui, en plus de la membrane cellulaire, comporte une paroi, a jusqu'à présent été peu étudiée. Ainsi le but des expérimentations qui font l'objet de ce paragraphe est d'évaluer la réponse de la membrane cellulaire des spores à l'action de l'ozone. Trois expériences ont été mises en place : l'évaluation du niveau de peroxydation des phospholipides membranaires, l'observation des spores au Microscope Electronique à Balayage (MEB) et au Microscope Optique après colorations.

1) Mesure du degré de peroxydation des phospholipides

a- Principe

Le degré de peroxydation des phospholipides membranaires est évalué par le dosage du MalonDiAldéhyde (MDA). Le MDA, $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$, résulte de la peroxydation des phospholipides à la suite d'un ensemble de réactions en chaîne (Figure 22).

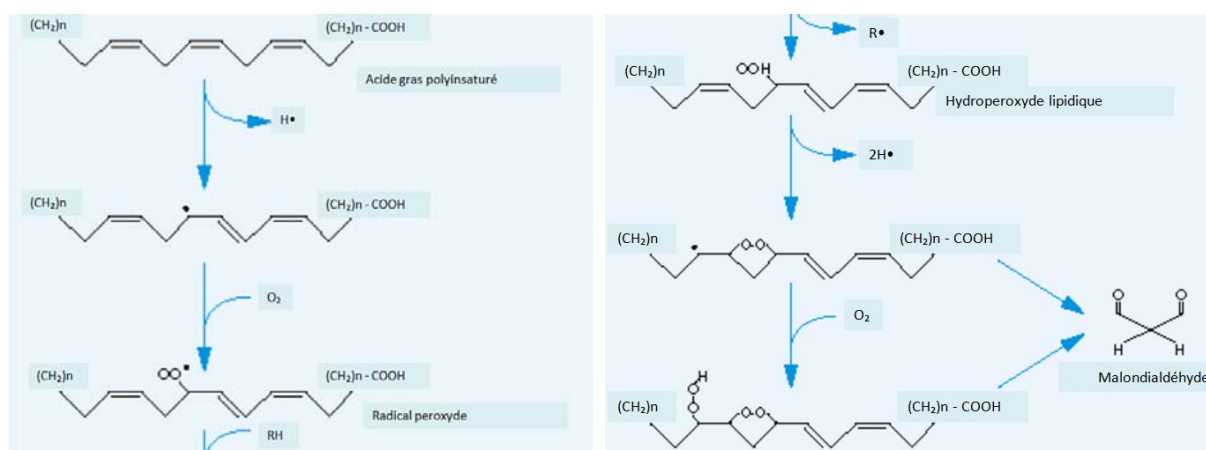


Figure 22 : Peroxydation des phospholipides membranaires, voie de synthèse du malondialdéhyde à partir d'acides gras polyinsaturés (Lefevre et al., 1998)

Le niveau de peroxydation des lipides est mesuré grâce à la réaction des MDA avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Ces deux molécules vont former un produit comportant un groupement chromophore à 532 nm, permettant ainsi la quantification du MDA par spectrophotométrie.

b- Mise en œuvre

Les suspensions de spores à analyser sont concentrées par centrifugation (2000 g, 1 min, 4 °C) à environ 2.10^6 spores dans un millilitre. Chaque échantillon est ensuite sonifié (VibraCell 75185, Sonics and Materials, USA) pendant 5 secondes. Le MDA est quantifié en utilisant le kit OXltek TBARS Assay Kit (Enzo, ALX-850-287).

Brièvement, il s'agit tout d'abord de préparer le réactif TBA et la gamme étalon faite à partir du MDA standard (Figure 23).

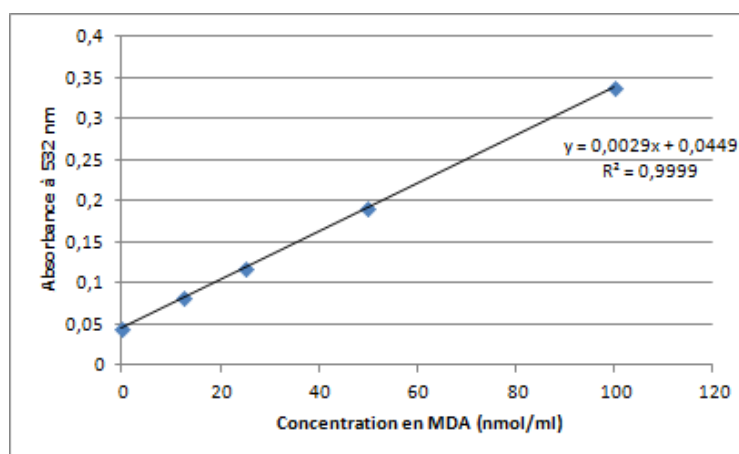


Figure 23 : Exemple de courbe de calibration obtenue à partir des standards de MDA

Cent microlitres d'échantillon ou de standard sont déposés dans un tube à hémolyse. Cent microlitres de SDS sont ajoutés afin de dissocier les structures membranaires. Les tubes sont complétés avec 2,5 mL de tampon TBA. Les tubes sont placés à l'étuve pendant une heure à 95 °C pour permettre la réaction MDA-TBA puis dans la glace pour stopper la réaction. Une centrifugation (2000 g, 15 min, 4 °C) permet de récupérer le surnageant avant analyse.

L'absorbance est mesurée à 532 nm (spectrophotometer Sunrise, Tecan, France). Une fois l'absorbance lue, le taux en MDA des échantillons analysés est déterminé à partir de la courbe étalon obtenue à partir de standards réalisés le même jour. La concentration en MDA (en nmol/mL) de chaque échantillon est ainsi calculée. Pour chaque échantillon, trois mesures sont réalisées.

2) Identification des modifications cellulaires par Microscopie Optique

Afin de vérifier dans quelle mesure l'ozone, au-delà de son action sur la membrane, pénètre dans le milieu cytoplasmique, deux colorations ont été employées.

a- Après coloration au bleu de Méthylène

Le bleu de Méthylène permet de visualiser les parois des spores peu visibles (Lachapelle, 2004) et de mieux discerner cytoplasme et membrane. Vingt microlitres de solutions de spores sont déposés sur lame auquel il est additionné autant de bleu de méthylène dilué au dixième. L'ensemble est mélangé délicatement à l'aide d'un cône pointu jusqu'à obtenir une couleur homogène. Après trois minutes d'attente, la lame est observée au microscope.

b- Après coloration au bleu de Trypan

Le bleu de Trypan est utilisé pour discriminer les cellules vivantes de celles ne présentant plus aucune activité (Strober, 2001). Les premières sont en effet capables de rejeter le colorant tandis que les secondes ne sont plus en mesure de le faire et se colorent en bleu. Dans un épendorf sont additionnés autant de solutions de spores que de bleu de Trypan. La solution est agitée vivement au vortex. Après trois minutes d'attente, 20 µL sont prélevés et déposés entre lame et lamelle.

3) Observation de la topographie de surface par Microscopie Electronique à Balayage

Afin de confirmer les modifications structurales de la membrane de la spore, les conidies de *V.inaequalis* ont été observées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB ESEM Quanta 250 FEG) au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB) de Toulouse. Le MEB permet de visualiser la topographie de surface des échantillons en trois dimensions. L'image se forme séquentiellement par le recueil d'électrons secondaires ou rétrodiffusés émis suite au balayage par un faisceau d'électrons de la surface de l'échantillon (Fernandez & Quellard, 1998).

Les solutions de spores doivent être totalement déshydratées. Deux protocoles de dessiccation ont été appliqués.

➤ **Protocole 1 : dessiccation à l'air libre et à température ambiante**

Cette méthode de dessiccation est courante, simple et peu onéreuse (Fernandez & Quellard, 1998). Les échantillons sont placés sur les supports métalliques d'observation et laissés tels quels pendant au moins deux heures à l'air libre et à température ambiante.

➤ **Protocole 2 : dessiccation par contournement du point critique**

Dans ce second protocole, la préparation des échantillons traités ou non-traités a tout d'abord consisté en l'addition d'un fixateur (composé de 2 % de glutaraldéhyde et d'un tampon Sorensen à 0,1 M) qui permet d'immobiliser les structures cellulaires. La déshydratation a été initiée par des bains d'alcool à concentrations croissantes. Puis l'alcool a été remplacé par du CO₂ liquide. La préparation a ensuite été portée de façon progressive au point critique du CO₂ (Température = 31°C et Pression = 73,8 bars) avant de dépasser ces valeurs. Le dioxyde de carbone gazeux a ensuite été éliminé et la préparation a été ramenée aux température et pression ambiantes.

Quelle que soit la méthode de dessiccation employée, les échantillons ont été recouverts de platine. La métallisation permet en effet la transmission des électrons. Les échantillons sont ensuite placés dans l'enceinte du MEB où un intense vide est appliqué. Ce vide a pour objectif de conserver la qualité du faisceau et d'éviter la contamination des échantillons. Il demande une dessiccation totale des objets observés d'où la nécessité de réaliser une phase de déshydratation au préalable (Fernandez & Quellard, 1998).

C- Action de l'ozone sur spores en cours de développement

1) Principe et objectifs

L'objectif initial était de vérifier l'efficacité du traitement sur spores en cours de germination et donc de prendre en compte l'évolution morphologique de la structure fongique lors du traitement. L'environnement d'application s'est vu complexifié car les tests ont demandé la mise au point d'un support de développement des spores.

Les spores sont déposées sur la matrice de germination qui correspond à une feuille de cellophane. Après cette phase d'inoculation et selon les modalités, les feuilles sont soumises à différents traitements.

2) Mise en œuvre

Les traitements à l'ozone ont été appliqués à des stades de germination différents, compris entre 0 heure et 48 heures après inoculation. Pour donner aux spores un support de germination permettant la croissance du mycélium et pour éviter les risques de collage et de formations de « pelotes » de mycélium, les spores ont été déposées sur feuilles de cellophane, mimant une feuille de pommier. Le protocole est présenté par la [Figure 24](#) et est décrit dans le [Tableau 15](#). Par souci de clarté, seule une modalité y est exposée : celle recevant le premier traitement 8 heures après l'inoculation.

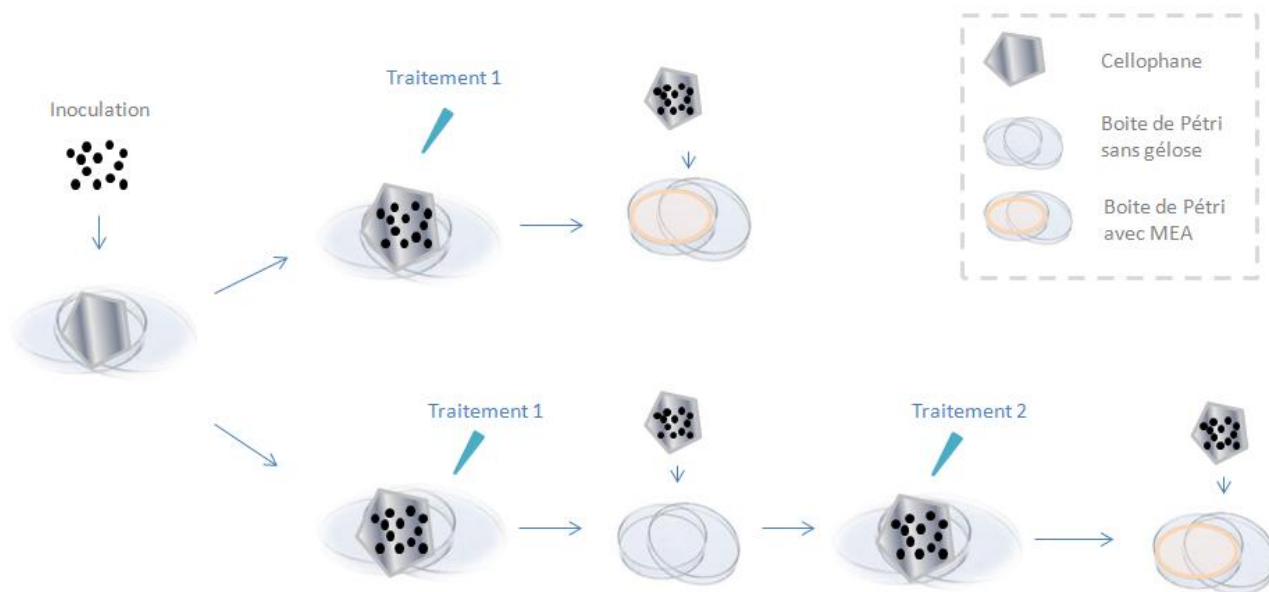


Figure 24 : Protocole d'évaluation de l'effet d'un ou deux traitements à l'eau ozonée sur spores en cours de germination

La première étape consiste en la réalisation d'une solution de spores de *V.inaequalis* concentrée à la hauteur de 1.10^5 spores/mL. Après deux dilutions consécutives au dixième, les feuilles de cellophane (qui correspond à des hydrates de cellulose) sont inoculées. Elles

avaient été préalablement autoclavées et déposées dans des boîtes de Pétri sans gélose. Elles constituent les matrices de germination.

Après inoculation, les boîtes sont placées en chambre de culture dans les conditions optimales de développement du champignon. L'eau ozonée est chargée jusqu'à saturation à une concentration d'ozone dans le gaz entrant de 35 g.m^{-3} (soit environ 8 mg.L^{-1} d'ozone dissous dans l'eau). Elle est ensuite appliquée 0 heure, 8 heures, 24 heures ou 48 heures après l'inoculation. Le témoin reçoit lui de l'eau stérile. Dans les deux cas, il est appliqué 1,5 mL de solution. Les feuilles de cellophane restent en contact avec l'eau stérile ou l'eau stérile ozonée pendant 45 minutes. Puis chaque feuille est retirée de la boîte de Pétri dans laquelle elle a reçu le traitement. Les feuilles ne subissant qu'un seul traitement sont déposées sur milieu gélosé (MEA). Celles attendant le deuxième traitement, sont placées dans de nouvelles boîtes de Pétri sans gélose. Le second traitement est appliqué 24 heures après le premier. Les boîtes de Pétri sont ensuite stockées en chambre de culture avant de procéder au comptage 11 à 13 jours plus tard.

Déroulé des opérations	Traitement des échantillons 8 heures après inoculation	
	1 seul traitement des feuilles	2 traitements des feuilles
Inoculation	Inoculation et placement en chambre de culture pendant 8 heures.	
Inoculation + 8h	Application du premier traitement (1,5 mL d'eau chargée en ozone ou d'eau stérile) pendant 45 minutes	
Inoculation + 8h45min	<ul style="list-style-type: none"> > Dépôt des feuilles de cellophane sur milieu gélosé (MEA) > Incubation pendant 11 jours 	<ul style="list-style-type: none"> > Dépôt des feuilles artificielles sur nouvelles boîtes de Pétri sans gélose > Placement des boîtes de Pétri pendant 24 heures en chambre de culture
Inoculation + 32h		Application du second traitement (1,5 mL d'eau ozonée ou d'eau stérile) pendant 45 minutes
Inoculation + 32h45min		<ul style="list-style-type: none"> > Dépôt des feuilles de cellophane sur milieu gélosé (MEA) > Incubation pendant 11 jours
Inoculation + 11-13 jours	Comptage	

Tableau 15 : Minutage du protocole d'évaluation de l'effet de l'eau chargée en ozone sur spores en cours de développement (Cas des échantillons recevant le premier traitement 8 heures après inoculation)

III- Etude de l'action de l'eau chargée en ozone sur des plants contaminés : modèle *in vivo*

A- Principe

Des jeunes plants de pommiers sont contaminés par vaporisation de spores de *V.inaequalis*. Ils sont maintenus en serres pendant 15 heures à humidité relative saturante à l'obscurité (Figure 25). La silice micronisée joue le rôle de mouillant avant la pulvérisation d'eau chargée en ozone ou d'eau stérile. Cinq traitements se succèdent à intervalle d'une heure. Maintenus à l'obscurité dans un premier temps, les plants sont à nouveau éclairés 48 heures après inoculation. Les comptages sont ensuite effectués selon l'échelle de sévérité qui s'inspire de celle élaborée par l'INRA.

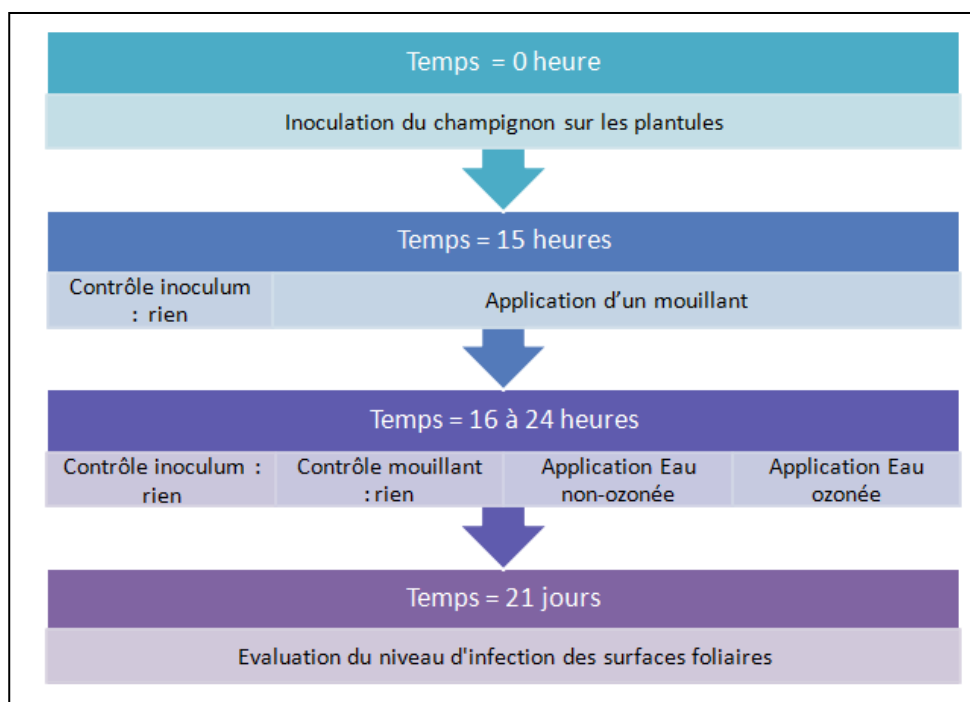


Figure 25 : Présentation des différentes phases de l'expérimentation sur modèle *in vivo*

B- Mise en œuvre

1) Obtention des plants

Les pépins ont été extraits de pommes Gala sorties des vergers de BlueWhale. Ils ont ensuite été séchés à température ambiante avant d'être stockés au réfrigérateur jusqu'à

utilisation. La vernalisation subie par les pépins est reproduite en laboratoire par une stratification à froid. Les pépins sont enfouis dans du sable de Fontainebleau humidifié avec de l'eau distillée. Les bacs remplis de sable sont entreposés pendant six semaines au froid positif entre 4 et 8 °C. Les pépins sont ensuite semés dans des godets de terreau (tourbes brune et blonde, NF 44-551), placés à la luminosité (12 heures de jour / 24 heures) et arrosés régulièrement à l'eau du réseau. Au bout d'environ trois semaines, les jeunes plants ont atteint le stade 3 à 4 feuilles, stade propice à l'inoculation (Figure 26).



Figure 26 : Jeunes plants au stade 3-4 feuilles

2) Inoculation

Au stade 3-4 feuilles, les jeunes plants sont répartis sur des plateaux correspondant chacun à une modalité testée. La feuille la plus jeune est marquée afin de distinguer durant la suite de la manipulation les feuilles ayant reçu l'inoculum et les traitements de celles nouvellement formées par le végétal. Dans la suite du manuscrit, cette feuille marquée sera appelée « feuille 1 » tandis que celle se trouvant à l'étage foliaire inférieur sera nommée « feuille 2 ».

Les jeunes plants sont placés dans une tente de culture, à l'obscurité. Une solution de conidies de *V. inaequalis* concentrées à environ $0,5 \cdot 10^5$ spores/mL est pulvérisée sur chaque jeune plant. Une cloche est ensuite apposée sur chacun des plateaux. L'humidité de chaque serre est élevée jusqu'à atteindre au moins 90 % d'humidité relative. La température de la tente est alors comprise entre 17 et 19 °C. Quatre modalités différentes, comportant entre 8 et 12 plantules selon les répétitions, sont menées en parallèle (Tableau 16).

Opération	Opération réalisée à :	Modalités			
		(1) Contrôles Inoculum (C)	(2) Contrôles Mouillant (C+Si)	(3) Témoins (T)	(4) Ozonés (Oz)
Inoculation	T + 0 heure	✓	✓	✓	✓
Pulvérisation Mouillant	T + 15 heures		✓	✓	✓
Application eau non-ozonée	T + 16 à 21 heures			✓	✓
Application eau ozonée					

Tableau 16 : Caractéristiques des quatre modalités du protocole A (protocole *in vivo* de base).

Ce protocole sera le protocole de base des expérimentations menées sur jeunes plants de pommiers (protocole A). Il sera décliné en deux variantes :

- le protocole B ou protocole « Séchage » dans lequel une étape de séchage sera introduite entre l'inoculation et l'application de l'eau ou l'eau chargée en ozone,
- le protocole C ou protocole « 2 traitements » qui se caractérisera par deux séries de traitements, la seconde intervenant 24 heures après la première.

3) Traitement à l'eau chargée en ozone

➤ Procédé d'ozonation utilisé

Il comporte une colonne de bullage de 200 mL à la base duquel se trouve à nouveau un fritté de verre. L'eau présente dans la colonne est chargée en ozone par bullage (Figure 27). Grâce à une pompe péristaltique, l'eau ainsi ozonée est envoyée dans une bouteille de stockage contenant jusqu'à deux litres d'eau. La pompe péristaltique maintient le circuit entre la bouteille de stockage et le réacteur. Progressivement, l'eau de la cuve de stockage se charge en ozone.

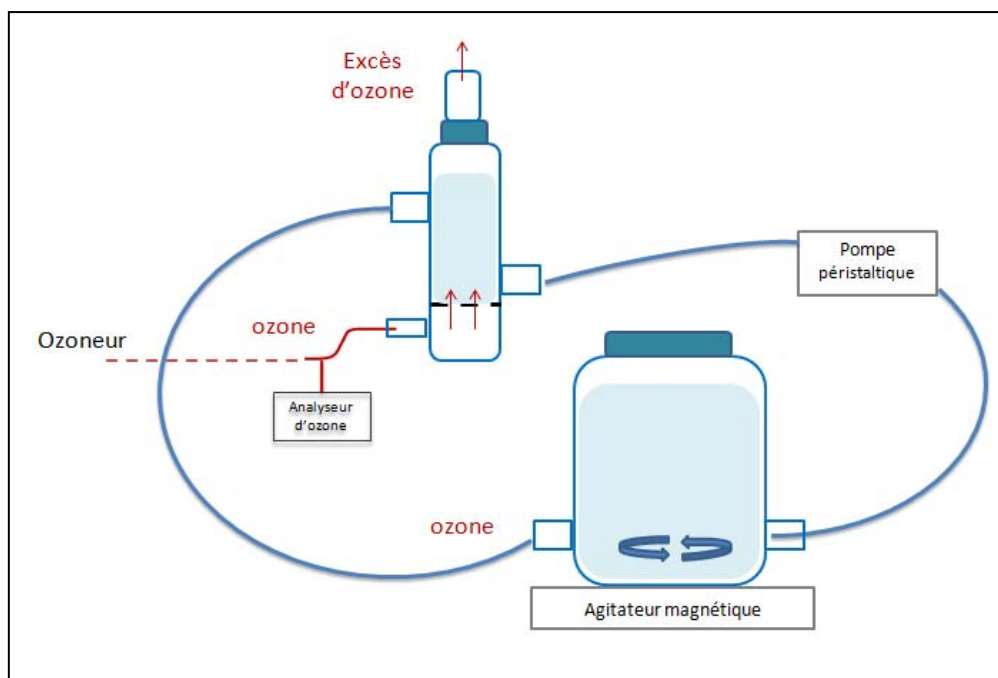


Figure 27 : Schéma du procédé de préparation de l'eau chargée en ozone comportant une colonne de bullage de 200 mL

➤ Application des traitements

Quinze heures après l'inoculation, la silice micronisée (22 mg/L) est appliquée par pulvérisation (environ 1 mL/plante) sur toutes les modalités à l'exception de la modalité Contrôle. Puis de la 16^{ème} et à la 21^{ème} heure, les modalités 3 et 4 sont traitées respectivement par eau déminéralisée non-ozonée ou par eau déminéralisée ozonée (2,5 mL environ par plant). Dans ce dernier cas, l'eau est chargée pendant une heure avec un gaz concentré à la hauteur de 60 g.m⁻³. La concentration en ozone dissous dans l'eau est alors d'environ 14,5 mg.L⁻¹. La pulvérisation est réalisée dans les minutes qui suivent l'arrêt du bullage afin de palier l'auto-décomposition rapide de l'ozone.

Durant l'ensemble des opérations décrites précédemment, une attention particulière est portée à l'humidité relative des serres qui doit rester supérieure à 90 %. Les serres sont ouvertes 48 heures après l'inoculation. L'humidité est alors maintenue pendant les jours suivants à environ 70 % et la température est comprise entre 20 et 23 °C.

4) Evaluation des performances du traitement par le degré de sévérité de la maladie

Trois semaines après inoculation, les symptômes de la maladie sont observés. La notation est effectuée selon l'échelle présentée [Tableau 17](#).

A	Notation	Pourcentage(s) de surface foliaire atteint(s)
	0	0 %
	1	Inférieur ou égale à 10 %
	2	10 à 25 %
	3	25 à 50 %
	4	50 à 75 %
	5	75 à 100 %
	6	100 %



Tableau 17 : (A) Echelle simplifiée du niveau de surface foliaire atteint par la tavelure (source : INRA Angers) et (B) jeune plant atteint par la tavelure

IV- Traitement des données

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel *XLSTAT*. Les jeux de données ont tout d'abord été soumis au test de Shapiro-Wilk afin de déterminer si les valeurs suivaient une distribution normale. Les tests réalisés *in vitro* ont été répétés au moins deux fois (excepté les observations sous microscope qui ont pu faire l'objet d'une seule répétition). Chaque répétition comprenait au moins deux répliques. Les expérimentations *in vivo* ont quant elles étaient effectuées au moins deux fois.

Si les conditions de normalité étaient respectées, les données étaient analysées par Analyse de Variance. Les différentes modalités étaient comparées au témoin grâce au test d'appariement de Newman-Keuls.

Dans le cas où les conditions de normalité n'étaient pas remplies, il était vérifié que les résidus normalisés étaient compris entre -3 et 3. Le cas échéant, l'analyse de variance, test considéré comme suffisamment robuste, était réalisée sur les données obtenues.

Le seuil de tolérance de l'erreur (α) a été fixé à 0,05.

Chapitre 3 :

Résultats

Ce chapitre présente les effets de l’ozone constatés sur différentes espèces fongiques durant les tests *in vitro* et *in vivo*. Il apporte les éléments explicatifs de l’action biocide de l’ozone.

I- Action de l’ozone sur spores *in vitro*

A- Evaluation de la viabilité des spores sous l’effet de l’ozone

1) Apport d’ozone par bullage dans des suspensions de spores

a- Evaluation de l’effet anti-germinatif

L’effet anti-germinatif de l’ozone appliqué par bullage sur suspensions de spores de *B.cinerea*, *V.inaequalis* et *N.alba* a été testé. Différentes modalités (durée d’application et concentration d’ozone) ont permis d’étudier l’impact de la dose d’ozone appliquée.

Les trois graphiques 28A, 28B et 28C (Figure 28) mettent en évidence que plus la dose en ozone est importante, plus le taux de germination mesuré sur cellules de Malassez des trois espèces fongiques décroît. Lorsque les doses appliquées sont supérieures à $0,07 \text{ mg.mL}^{-1}$, les taux de germination de *B.cinerea*, *V.inaequalis* et *N.alba* sont comparables et proches de 0 % (respectivement inférieurs à 2,6 ; 3,8 et 0,5 %). Ils sont statistiquement différents des taux de germination enregistrés pour les témoins (modalité 0a) dont les valeurs sont respectivement de 80,0 ; 40,5 et 54,2 %.

Lorsque les doses d’ozone sont comprises entre $0,01$ et $0,07 \text{ mg.mL}^{-1}$, il apparaît des différences de sensibilité entre les champignons. *B.cinerea* ainsi que *V.inaequalis* semblent moins sensibles que *N.alba*. En effet, appliquer une dose de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ (modalité 8) suffit à limiter le taux de germination de *N.alba* à la hauteur de 5,8 %. Dans le cas des deux autres espèces fongiques, cette même dose ne permet pas de réduire de façon significative le nombre de spores germées par rapport aux témoins. Concernant *B.cinerea* et *V.inaequalis*, il est nécessaire d’appliquer une dose de $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$ pour que le taux de germination enregistré soit significativement plus faible que celui du témoin. La dose de $0,07 \text{ mg.mL}^{-1}$ est nécessaire pour atteindre des taux de germination inférieurs à 10 %.

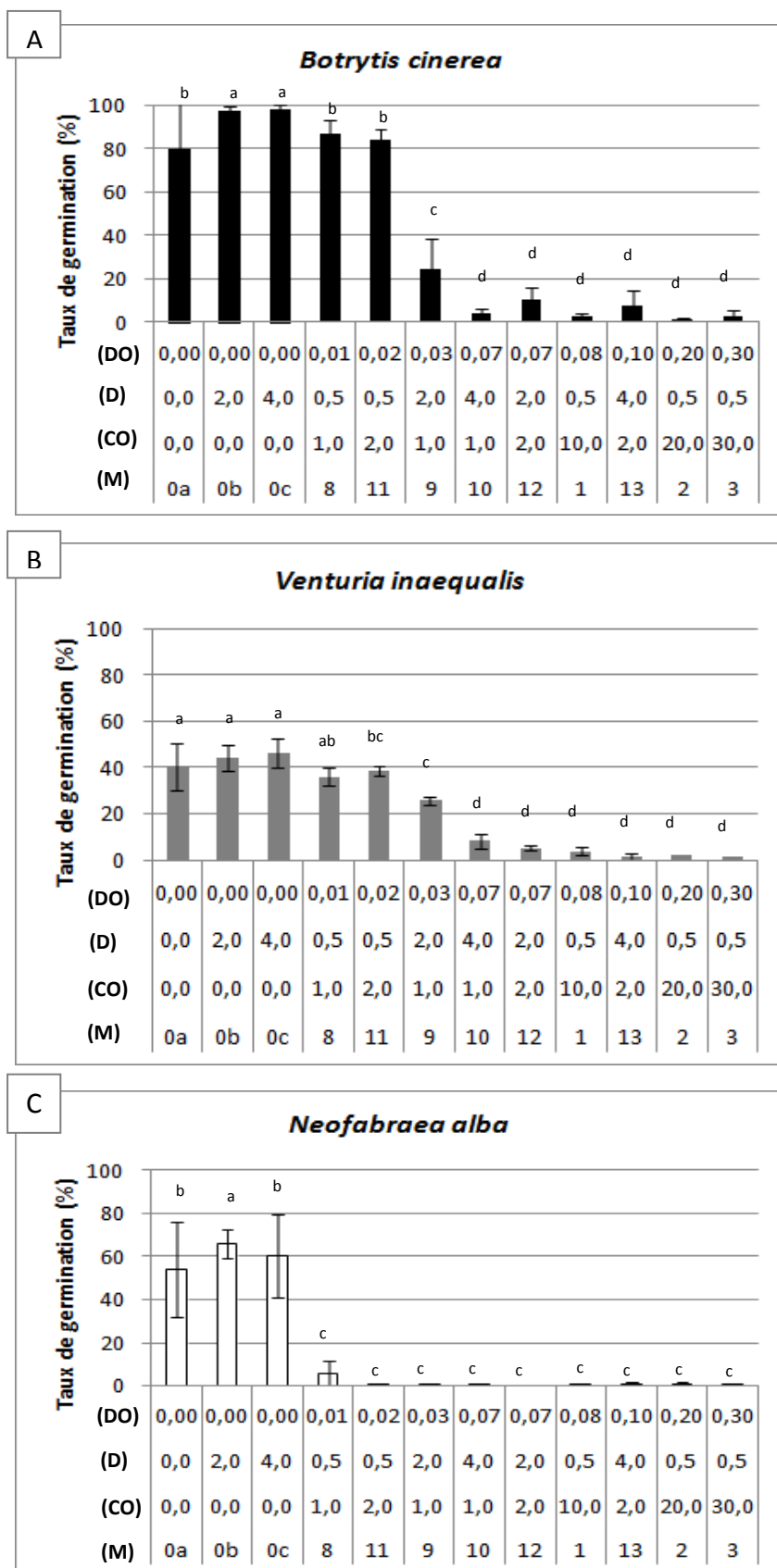


Figure 28 : Influence des différentes modalités de bullage d’ozone sur les taux de germination de (A) *B.cinerea*, (B) *V.inaequalis* et (C) *N.alba*. Les modalités non-différentes sont regroupées par une même lettre (Tests Newman-Keuls, $\alpha = 0,05$)

(DO) = Dose d’ozone en mg.ml^{-1} ; (D) = Durée de bullage en minute ; (CO) = Concentration en Ozone dans le gaz entrant (en g.m^{-3}) et (M) = Modalité.

Il a été appliqué un bullage d'air sans ozone pendant 2,0 et 4,0 minutes (modalités 0b et 0c). Il n'entraîne aucune diminution du taux de germination. C'est donc bien l'application de l'ozone et non l'action mécanique de bullage ou l'air appliqué qui limite le développement fongique et ceci quel que soit le micro-organisme considéré. Dans certains cas, le bullage d'air semble favoriser le taux de germination (cas de *B.cinerea* et *N.alba*). On peut supposer que l'agitation ou l'oxygénation liées à l'action de bullage est favorable à la dynamique de germination.

Parallèlement au comptage des spores germées sur cellules de Malassez, le développement mycélien de solutions de spores de *V.inaequalis* traitées a été observé après ensemencement sur boîtes de Pétri (Figure 29). Plus la dose d'ozone est importante, plus l'efficacité du traitement augmente. En effet, au-delà de $0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$, le nombre de départs mycéliens est inférieur à 3,3 % contre 63,1 % dans le cas du témoin. En deçà, les doses ne suffisent pas à limiter le nombre de spots mycéliens présents sur boîtes. Des écarts sont visibles lorsque l'on compare le taux de germination mesuré sur cellules de Malassez et la croissance mycélienne observée sur boîtes.

Cet écart peut s'expliquer par la différence de sensibilité des expérimentations. En effet, la mesure de germination sur cellules de Malassez, réalisée 24 heures après inoculation, ne permet pas de comptabiliser les spores qui ont un départ de germination lent ou retardé (peut-être affecté par l'ozone). En revanche, le comptage de départs mycéliens sur milieu gélosé évalué au bout de 11 jours permet de compter ces spores. Ainsi, aux doses intermédiaires, des écarts sont observés pour des temps d'application courts où l'on ralentirait la cinétique de germination mais ne tuerait pas les spores (modalités 9 et 12 où le temps de contact a été de 2 minutes). Avec un temps de contact plus long de 4 minutes (modalité 10), les départs mycéliens sont totalement inhibés aussi bien sur cellules de Malassez que sur milieux gélosés.

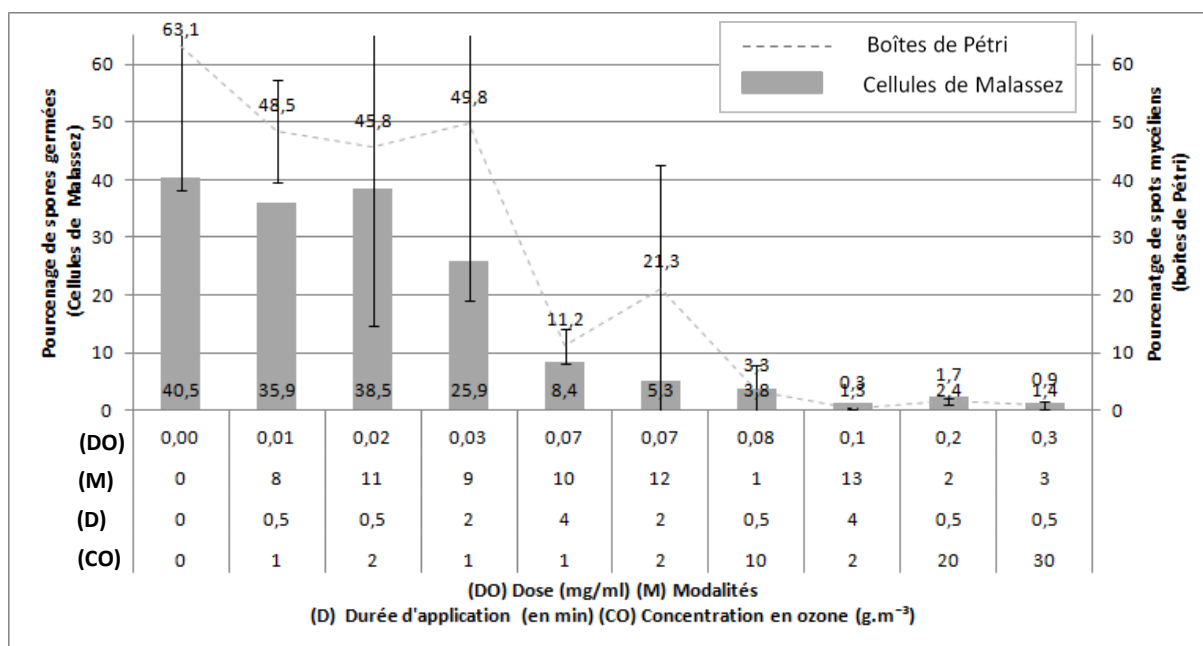


Figure 29 : Evaluation de l'effet du bullage de l'ozone sur les spores de *V.inaequalis* par cellules de Malassez et sur milieu gélosé.

Ces premiers résultats confirment donc que le traitement par bullage à l'ozone a un effet inhibiteur sur la germination des spores de *B.cinerea*, *V.inaequalis* et *N.alba*. L'effet de l'ozone sur *B.cinerea* avait déjà été démontré dans la littérature mais lors de l'application d'ozone gazeux sur spores (Minas et al., 2010; Ozkan et al., 2011; Sharpe et al., 2009).

L'effet inhibiteur démontré est totalement cohérent avec ce que rapporte la bibliographie (Khadre et al., 2001; Miller et al., 2013). En revanche, les conditions d'application de l'ozone étant très variables d'une publication à une autre, il est difficile de comparer les doses appliquées. De plus, comme cela a été observé, la sensibilité à l'ozone dépend des espèces concernées (Palou et al., 2001).

Seule la publication de Komanapalli et Lau (1996) où les conditions d'ozonation sont très proches de celles mises en œuvre durant notre travail permet une comparaison. Nous avons observé que la dose minimale appliquée pour limiter le développement des spores est, selon les espèces, comprises entre 1,0 et 7,0 x 10⁻⁷ mg d'ozone/spore. La dose minimale calculée avec les données de la publication de Komanapalli et Lau (1996) pour initier l'inactivation des bactéries est du même ordre, approximativement 2,4 x 10⁻⁷ mg d'ozone/cellule.

De façon générale, il semblerait que les bactéries soient plus sensibles que les spores de champignons. Cette observation a déjà été faite par Restaino et al. (1995). Cela peut s'expliquer par les variations de la composition et de la structure de la surface cellulaire (Alexopoulos et al., 2013). Les bactéries ne sont pourvues que d'une membrane cellulaire tandis que les spores fongiques ont une double protection, la membrane et la paroi fongique composée principalement de chitine et de glucane. La variation de sensibilité pourrait également résulter de différences de systèmes de défenses contre le stress oxydatif (Antony-Babu & Singleton, 2009).

Des variations de sensibilité entre champignons avaient déjà été constatées par certains auteurs comme Palou et al (2001) qui observent des différences de croissance radiale entre deux espèces du genre *Penicillium* (*P.italicum* et *P.digitatum*). Si le premier voit sa croissance radiale se réduire de façon significative après 4 jours d'application d'ozone gazeux (0,3 ppm à 5 °C), le second reste insensible aux mêmes conditions expérimentales.

b- Evaluation des effets des conditions d'ozonation

Si dans le cas des concentrations égales ou supérieures à 10 g.m^{-3} , l'application d'ozone inhibe la germination des spores même avec une durée de traitement faible (0,5 minute), des nuances sont à apporter concernant les concentrations inférieures à 10 g.m^{-3} . Ainsi, la diversité de sensibilité constatée entre les espèces est notamment visible pour les doses les plus faibles.

Dans l'optique de déterminer l'importance des facteurs d'ozonation (durée de contact et concentration d'ozone dans le gaz vecteur) à partir des données obtenues, des surfaces de réponses du taux de germination ont été établies en fonction de la concentration (comprise entre 1 et 2 g.m^{-3}) et du temps de bullage (allant de 0 à 4 minutes) pour chacune des espèces fongiques étudiées (Figures 30, 31 et 32).

➤ Cas de *B.cinerea*

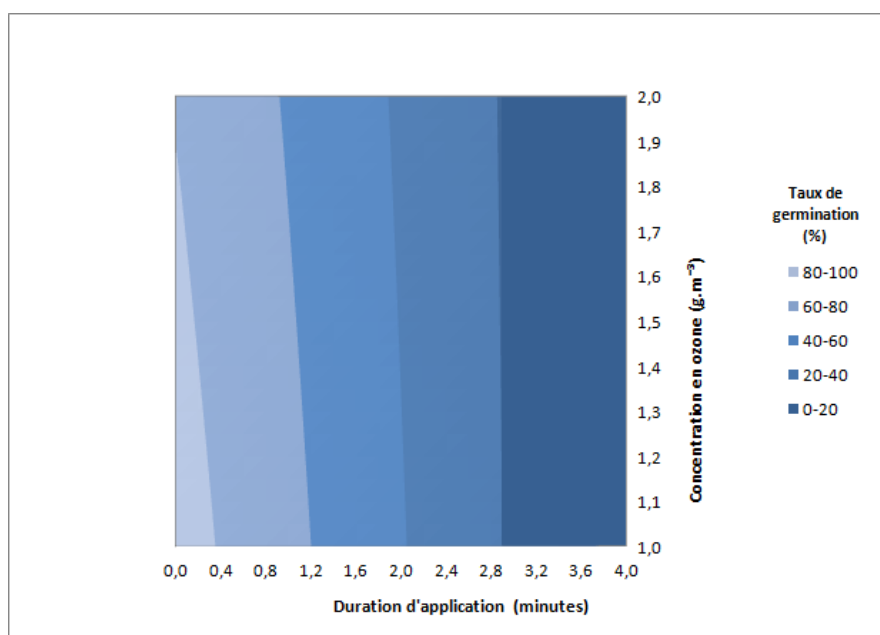


Figure 30 : Réponse du taux de germination de *B.cinerea* en fonction de la concentration en ozone et de la durée d'application.

La surface de réponse du taux de germination des spores de *B.cinerea* comporte cinq classes qui se répartissent sur l'axe de la durée d'application (Figure 30). Ainsi, dans le cas d'une concentration en ozone fixée, à titre d'exemple, à $1,5 \text{ g.m}^{-3}$, le taux de germination est compris entre 60 et 80 % lorsque le temps de bullage est de 0,5 minute. Pour la même concentration, la viabilité des spores n'excède pas 20 % si la durée d'application s'élève à 3,5 minutes. En revanche, pour une durée d'application donnée, augmenter la concentration en ozone dans le gaz entrant ne permet pas d'améliorer les performances du traitement. A titre d'exemple, ozoner pendant 3,5 minutes à une concentration de 1 ou 2 g.m^{-3} ne permet aucune amélioration de l'efficacité du traitement : le taux de germination sera compris entre 0 et 20 %. Ainsi, dans le domaine expérimental étudié (soit pour des concentrations inférieures à 2 g.m^{-3} et des durées d'application comprises entre 0 et 4 minutes), le paramètre le plus influant sur l'inhibition de la germination des spores de *B.cinerea* est le temps de bullage. La molécule d'ozone doit entrer en contact avec le micro-organisme pour agir. Il faut donc apporter suffisamment de molécules d'ozone pour réagir avec tous les micro-organismes présents dans la suspension. Pour cela, prolonger le temps d'application permet de transférer dans la phase aqueuse une grande quantité d'ozone pouvant réagir avec les micro-organismes présents.

➤ Cas de *V.inaequalis*

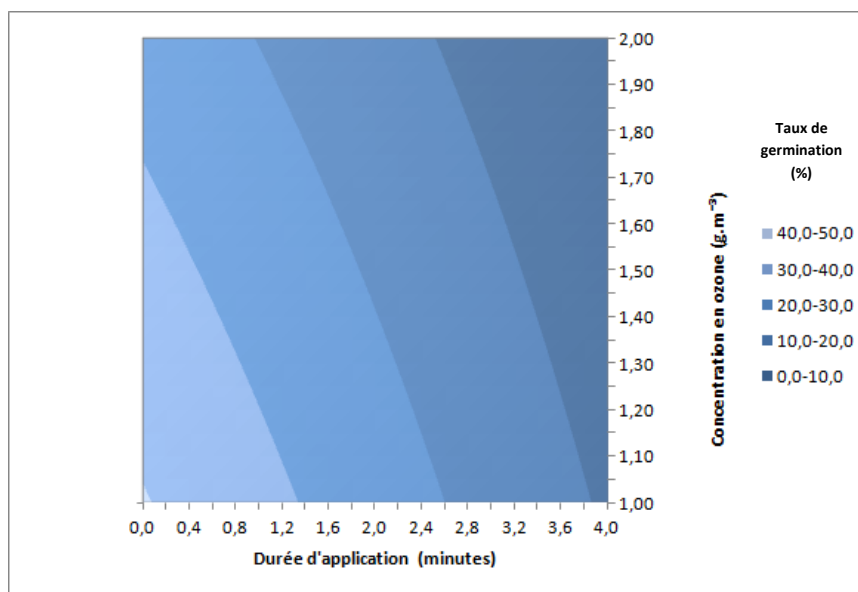


Figure 31 : Réponse du taux de germination de *V.inaequalis* en fonction de la concentration en ozone et de la durée d'application.

Dans le même domaine d'expérimentation, une réponse semblable est constatée avec les spores de *V.inaequalis* (Figure 31) mais la prépondérance du temps de bullage est moins prononcée que dans le cas de *B.cinerea*.

Pour une même concentration en ozone, augmenter le temps de bullage permet également d'améliorer les performances du traitement. Par exemple, à une concentration de 1,5 g.m⁻³, ozoner pendant 0,5 minute ne réduit pas le taux de germination de façon significative par rapport au témoin (il sera compris entre 30 et 40 %) tandis que traiter, à cette même concentration, pendant 3,5 minutes entraîne une réduction du taux de germination qui sera alors inférieur à 10 %. A la différence de *B.cinerea*, augmenter la concentration a une certaine influence. En effet, si un bullage de 3,5 minutes à 2 g.m⁻³ permettait de limiter le taux de germination à moins de 10 %, une concentration de 1 g.m⁻³ pendant ce même laps de temps aurait donné lieu à un taux de germination supérieur, compris entre 10 et 20 %.

Dans le cas de *V.inaequalis*, le temps de bullage reste toutefois le paramètre le plus important.

➤ Cas de *N.alba*

La surface de réponse de *N.alba* (Figure 32) est majoritairement constituée d'une classe. Le taux de germination y est compris entre 0 et 10 %. Cela confirme la forte sensibilité de cette espèce à l'ozone dans le domaine expérimental considéré ici.

A la différence des deux autres espèces, la plage de variation de concentrations et de durées choisie n'était pas adaptée à la sensibilité de *N.alba*. Il aurait été nécessaire de s'intéresser à des doses plus faibles obtenues avec des concentrations inférieures à 1 g.m^{-3} , voire avec des périodes de bullage plus courtes.

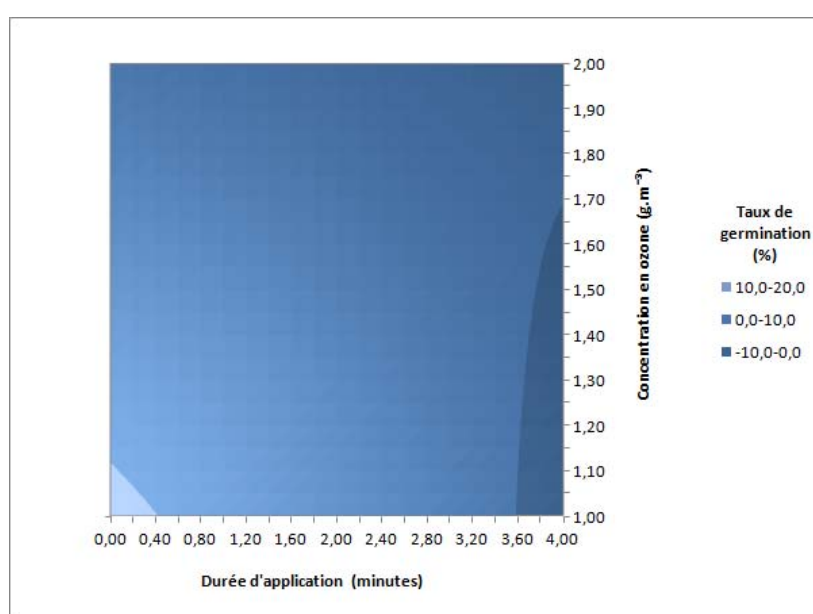


Figure 32 : Réponse du taux de germination de *N.alba* en fonction de la concentration en ozone et de la durée d'application.

➤ Spécificité de sensibilité des espèces fongiques aux facteurs d'ozonation

La comparaison des modèles des plans d'expériences ayant servi à la constitution des surfaces de réponse de *B.cinerea*, *V.inaequalis* et *N.alba* met clairement en évidence la spécificité de sensibilité des espèces fongiques aux facteurs d'ozonation (Tableau 18).

Espèce fongique	Equations modélisant le taux de germination (Y) en fonction du facteur X_1 (= concentration en ozone) et du facteur X_2 (= durée d'application)
<i>B.cinerea</i>	$Y_{Bc} = 39,4 - 1,8 X_1 - 44,3 X_2 + 2,8 X_1 X_2$
<i>V.inaequalis</i>	$Y_{Vi} = 19,0 - 5,7 X_1 - 14,3 X_2 + 1,5 X_1 X_2$
<i>N.alba</i>	$Y_{Na} = 2,7 - 2,3 X_1 - 3,0 X_2 + 3,3 X_1 X_2$

Tableau 18 : Equations à variables codées modélisant le taux de germination (Y) des trois espèces fongiques où X_1 représente la concentration en ozone, où X_2 correspond à la durée d'application du traitement et où X_1X_2 correspond à l'interaction de ces deux paramètres.

Quelle que soit l'espèce considérée, le coefficient du facteur « durée d'application » (X_2) est le plus élevé. Néanmoins, les espèces se distinguent par l'importance relative de la concentration d'ozone (X_1) par rapport à la durée d'application (X_2). Ainsi pour *B.cinerea*, le poids de la durée d'application est bien plus élevé que le poids de la concentration en ozone (coefficient - 44,3 face à - 1,8). Cet écart est en revanche moins prononcé au niveau de l'équation de *V.inaequalis*, où le coefficient de X_2 est seulement 2,5 fois plus élevé que celui de X_1 .

Au contraire pour *N.alba*, la concentration en ozone et la durée d'application ont quasiment les mêmes influences sur le taux de germination (coefficient respectif de - 2,3 et - 3).

En résumé, plus la dose appliquée est importante, plus l'inactivation des spores est prononcée. Ainsi, le nombre de molécules capables de réagir avec les micro-organismes présents est plus élevé. La même conclusion était apportée par Komanapalli and Lau (1996) qui démontraient qu'une exposition courte en solution aqueuse pouvait être insuffisante pour inactiver les bactéries telles qu'*Escherichia coli* mais qu'augmenter la durée d'exposition aboutissait à la diminution de la viabilité des cellules.

A l'aide d'ozone sous forme gazeuse, Ames, Feliziani, & Smilanick (2013) ont eux aussi confirmé l'importance de la dose d'ozone appliquée. L'exposition à une atmosphère gazeuse de spores de différentes espèces pendant 3 à 4 semaines permettait de limiter le taux de germination à 50 % tandis qu'une exposition de l'ordre de 8 à 12 semaines amenait ce même taux à environ 5 %. Des conclusions similaires ont été rapportées par Minas et al. (2010). La

germination des spores de *B.cinerea* était diminuée par une augmentation de la durée d'exposition à l'ozone : le taux de germination des spores passait de près de 99 % après 2 heures d'exposition à moins de 1 % après 72 heures.

A dose appliquée équivalente, un grand temps d'application et une faible concentration doivent être privilégiés à un couple « temps court-concentration élevée ». Au sein de notre colonne de bullage, l'augmentation de la période de traitement permet la stabilisation du système d'ozonation et l'amélioration du transfert gaz-liquide. En effet, la quantité d'ozone transférée augmente avec l'accroissement du temps de contact gaz-liquide (Tapp and Rice, 2012).

En conclusion, ces premiers tests ont permis de confirmer l'effet inhibiteur du bullage de l'ozone sur le développement des spores de *B.cinerea*, *V.inaequalis* et *N.alba*. Si cet effet inhibiteur apparaît clairement dans la majorité des tests de viabilité rapportés dans la littérature, des données contradictoires coexistent concernant la capacité de l'ozone à limiter de façon définitive le développement des spores. Ainsi, Minas et al. (2010) observent que, même au-delà de 72 heures après l'arrêt de l'exposition à de l'ozone gazeux, les spores de *B.cinerea* ne sont toujours pas en mesure de se développer. Ces auteurs en concluent que l'ozone a un effet létal et irréversible sur les spores. A l'inverse, Mylona et al. (2014) ont montré que les spores de *Fusarium verticillioides*, pourtant complètement inhibées durant les 24 premières heures après le traitement, recouvraient leur capacité de germination entre 2 et 4 jours après l'arrêt de l'ozonation. Le taux de germination atteignait 100 % au bout de 8 jours.

Les différences constatées dans les conclusions des deux études précédentes peuvent résulter, d'une part, de la différence de sensibilité inhérente aux espèces fongiques et, d'autre part, aux spécificités des modes opératoires. Compte-tenu de ces constats, la phase suivante de notre étude a consisté à s'assurer que les spores des champignons ciblés étaient totalement inhibées dans nos conditions expérimentales.

c- Confirmation du caractère létal de l'ozone

Après ozonation, les spores sontensemencées sur boîtes de Pétri. L'observation du développement de *V.inaequalis* a permis de vérifier le caractère létal du traitement à

l’ozone. Les photographies (Figure 33) réalisées, soit onze jours (A), soit trente jours (B) après l’application du traitement, rendent compte du développement mycélien.

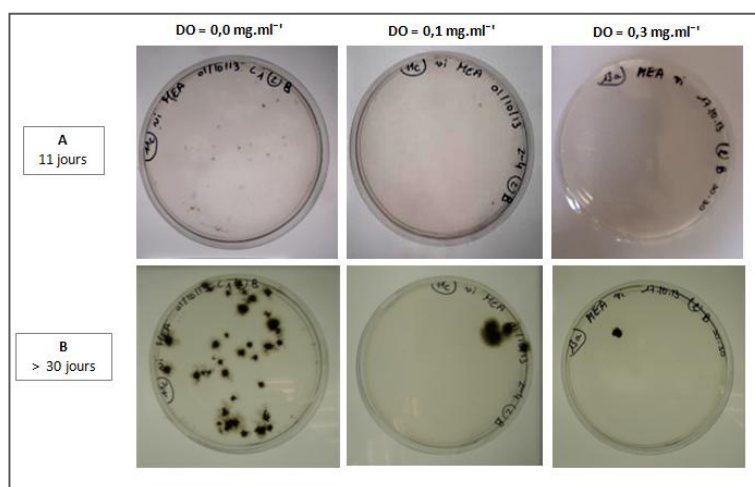


Figure 33 : Développement mycélien sur boîtes de Pétri après inoculation des spores de *V.inaequalis* traitées ou non-traitées après 11 jours (série A) et après 30 jours (série B) en chambre de culture. (DO = Dose d’ozone appliquée en mg.mL⁻¹)

Après onze jours en chambre de culture, le milieu gélosé témoin comporte de nombreux spots mycéliens. Pour les modalités traitées, très peu de départs mycéliens sont visibles à 11 jours (abattement de plus de 90 %). L’efficacité antifongique de l’ozone apparaît ici clairement. Après trente jours en chambre de culture, les boîtes traitées ne comptent pas d’autre développement mycélien. Les spores atteintes le sont donc définitivement et aucune d’entre elles ne reprend son développement après avoir été touchée. L’efficacité létale de l’ozone est donc clairement démontrée dans nos conditions expérimentales.

Ce caractère létal du traitement à base d’ozone a également été vérifié par le même suivi sur les suspensions de spores de *B.cinerea* (Figure 34).

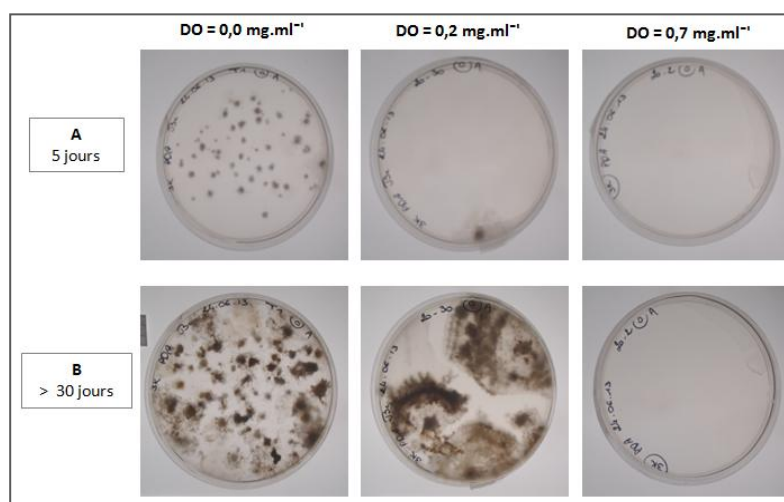


Figure 34 : Développement mycélien sur boîtes de Pétri après inoculation des spores de *B.cinerea* traitées ou non-traitées après 5 jours (série A) et après 30 jours (série B) en chambre de culture. (*DO* = Dose d'ozone appliquée en mg.mL^{-1})

Après 30 jours en chambre de culture, les milieux gélosés portant les suspensions de spores traitées comptent aucun champignon excepté la dose la plus faible ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$). Dans ce cas, environ 3 % des spores n'avaient pas été atteintes par l'ozone. Ces spores se sont ensuite développées et occupent 30 jours après toute la place. Par ailleurs, l'ozone stoppe définitivement le développement fongique dans les conditions expérimentales mises en œuvre ici. En effet, aucun spot mycélien n'est visible après 30 jours dans le cas de la dose d'ozone la plus élevée ($0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$).

2) Apport d'eau chargée en ozone sur suspensions de spores

a- Effet anti-germinatif

En raison des faibles concentrations en spores de *P.syringae* obtenues dans les suspensions préparées, l'évaluation de l'effet de l'ozone a été réalisée par l'addition à une suspension de spores d'eau préalablement chargée en ozone et non plus par bullage. Il s'agissait de s'assurer que cette espèce fongiforme ne présentait pas de résistance à l'ozone. Les suspensions traitées sont comparées aux suspensions de spores témoins sur boîtes de Pétri (Figure 35).

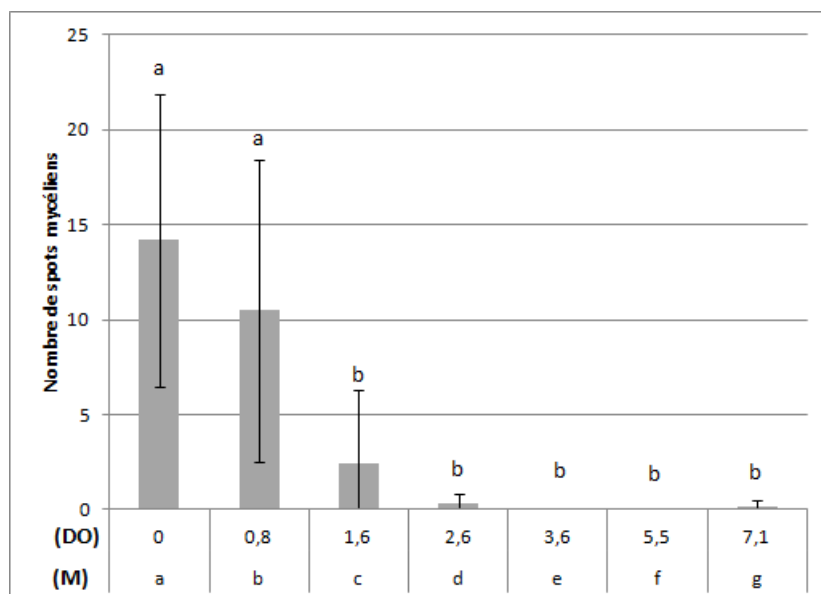


Figure 35 : Evaluation de l'effet de l'eau chargée en ozone sur les spores de *P.syringae*. Les modalités (3 répétitions de 3 essais) sont regroupées en groupes statistiquement différents obtenus par Analyse de Variance. Chaque groupe porte une lettre.

(DO) Dose en ozone ($\cdot 10^{-3}$ mg.mL⁻¹) et (M) Modalité.

Sur les milieux gélosés ayant reçu les solutions témoins (modalité a), 14 spots mycéliens en moyenne sont comptés. L'addition d'eau chargée en ozone à la suspension de spores diminue ce nombre. L'ajout de 100 μ L d'eau chargée en ozone (modalité b), correspondant à une dose de $0,8 \cdot 10^{-3}$ mg.mL⁻¹, semble diminuer le pourcentage de germination (de 25 % environ) mais pas de façon significative par rapport au témoin. A partir de l'ajout d'un volume de 200 μ L d'eau chargée en ozone (modalité c), c'est-à-dire d'une dose en ozone dissous de $1,6 \cdot 10^{-3}$ mg.mL⁻¹, le nombre de spots mycéliens est significativement différent et est inférieur à 3. Pour les doses plus élevées, de 2,6 à $7,1 \cdot 10^{-3}$ mg.mL⁻¹ (modalités d à g), ce nombre devient quasiment nul.

Ainsi, l'addition d'eau chargée en ozone sur les spores de *P.syringae* permet de limiter leur développement. Pour autant, les doses minimales nécessaires à l'arrêt de la germination des spores de *P.syringae* ne sont pas comparables avec celles trouvées lors des précédents tests réalisés sur *B.cinerea*, *V.inaequalis* et *N.alba* (les valeurs obtenues sont commentées ci-après). Plusieurs paramètres peuvent expliquer ces différences : les espèces

considérées, le niveau de concentrations des suspensions de spores et le mode d'application de l'ozone.

B.cinerea, *V.inaequalis* et *N.alba* appartiennent au groupe des Ascomycètes tandis que *P.syringae* est un Oomycète. Ces groupes d'espèces sont phylogénétiquement éloignés et ont donc des constitutions pariétales différentes. Par ailleurs, il a été démontré qu'au sein d'un même groupe, les espèces peuvent avoir des réponses à l'ozone différentes (Palou et al., 2001).

Les solutions de spores de *B.cinerea*, *V.inaequalis* et *N.alba* comptaient environ 1.10^5 spores.mL⁻¹ ce qui conduit, dans nos conditions de bullage, à une dose d'ozone appliquée comprise entre 1.0 et 7.0×10^{-7} mg d'ozone/spore. Les suspensions de spores de *P.syringae* ne comportaient qu'environ 1 à 3.10^2 spores.mL⁻¹. La dose d'ozone appliquée par spore était donc de l'ordre de $2,2.10^{-5}$ à $8,7.10^{-6}$ mg d'ozone/spore.

Outre l'effet concentrations en spores, le mode d'application de l'ozone influence l'efficacité du traitement. Il s'agissait, dans le premier cas, d'un bullage d'ozone continu directement dans la suspension de spores et, dans le second cas, de l'addition d'eau préalablement ozonée. La Figure 36 représente, de façon schématique, la concentration en ozone dissous dans l'eau en fonction du temps pour chacun des deux traitements afin de mieux expliquer les phénomènes impliqués. La courbe représentant le procédé par « bullage de l'ozone » (courbe bleue) a été réalisée en supposant que le transfert de l'ozone dans l'eau est plus rapide que la réaction de l'ozone avec la matière organique présente, en raison de la faible quantité de matières organiques dans la solution.

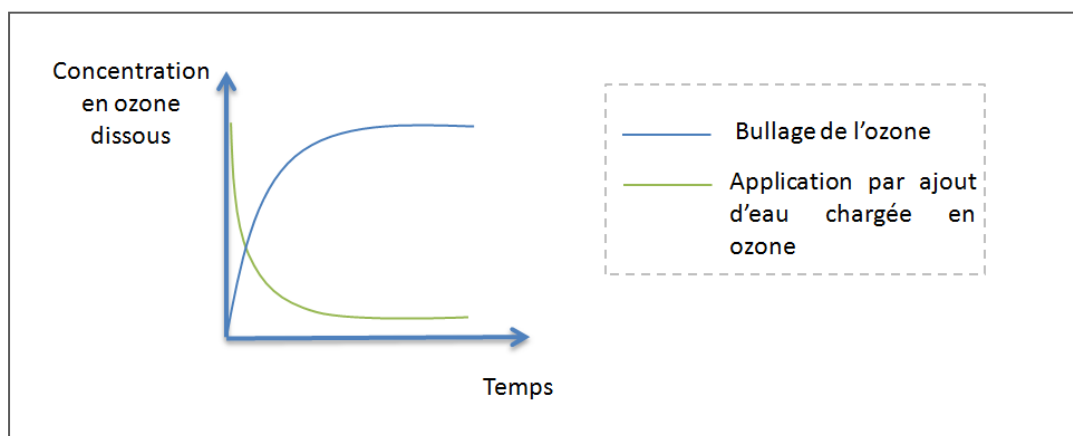


Figure 36 : Schéma représentant les courbes théoriques de la concentration en ozone dissous dans l'eau en fonction du temps et selon le mode d'application.

Le bullage permet une alimentation permanente en ozone. L'ozone va tout d'abord être transféré dans l'eau et va pouvoir ainsi être mis en contact avec les spores. L'ozone va réagir avec ces molécules organiques et va ainsi être consommé mais immédiatement remplacé par les nouvelles molécules d'O₃ apportées par le gaz vecteur. Une fois les réactions ozone/matières organiques terminées, l'ozone nouvellement apporté va continuer à se dissoudre dans l'eau jusqu'à saturation. Le niveau maximal de transfert de l'ozone dans l'eau peut être calculé à l'aide de l'équation d'Henry.

Dans le cas de l'ajout d'eau chargée en ozone, les molécules consommées ne sont pas remplacées. Par ailleurs, des molécules d'ozone vont également disparaître par désorption ou parce qu'ayant atteint leur durée de vie maximale (décomposition en oxygène). La concentration en ozone dissous dans l'eau va progressivement diminuer dans le temps.

b- Caractère létal de l'ozone

Afin de s'assurer que pour *P.syringae* la baisse du taux de germination est bien liée au caractère létal de l'ozone, les solutions de spores ont étéensemencées sur boîtes de Pétri et maintenues en chambre de culture. Les photographies de la [Figure 37](#) montrent trois modalités de la même répétition, à sept jours de l'ensemencement puis après un mois.

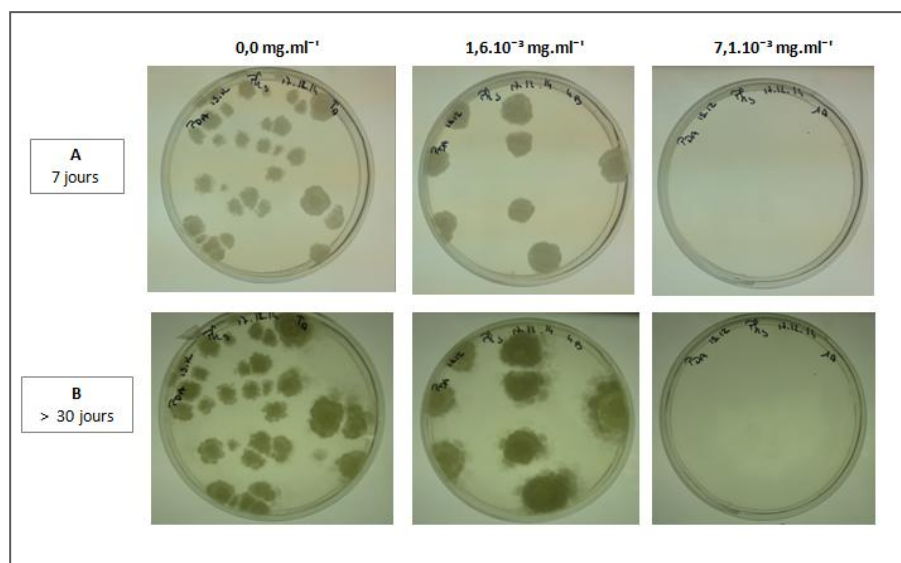


Figure 37 : Développement mycélien sur boîtes de Pétri après inoculation des spores de *P.syringae* traitées (modalités c = 1,6.10⁻³ mg.mL⁻¹ et g = 7,1.10⁻³ mg.mL⁻¹) ou non-traitées (0,0 mg.mL⁻¹) après 7 jours (série A) et après 30 jours (série B) en chambre de culture.

Les solutions de spores non-traitées conduisent à un développement important de spots mycéliens à sept jours. La croissance de ceux-ci continue durant le mois d'incubation (photos B). La boîte de Pétri comportant l'échantillon traité avec une forte concentration en ozone (modalité g) ne montre pas de développement mycélien après sept jours d'incubation, confirmant l'effet inhibiteur de la germination des spores du traitement à l'ozone. Après un mois, les boîtes ne montrent aucun développement mycélien. A l'image de ce que l'on a observé pour les autres espèces étudiées, l'ozone possède un effet létal sur les spores de *P.syringae*.

Pour une concentration intermédiaire en ozone dissous, on observe l'apparition de spots mycéliens : 35 % des conidies ne sont pas touchées par l'ozone. Cependant, après un mois, seules les conidies non-atteintes par le traitement et présentes dès le septième jour continuent à se développer. Aucun nouveau spot mycélien n'est observé, ce qui atteste l'effet létal de l'ozone.

3) Conclusions

Quel que soit le champignon considéré de notre étude et quelles que soient les conditions de contact entre spores et ozone, ce dernier montre un effet d'inhibition de la germination des spores. Les spores perdent alors leur viabilité comme nous avons pu le constater sur les boîtes de Pétri.

D'autre part et tout comme cela avait été mis en évidence par d'autres études, des différences de sensibilité ont été observées entre espèces. *N.alba* est la plus sensible des trois espèces traitées par bullage de l'ozone dans la suspension de spores. Cela peut notamment s'expliquer par une différence de taille, de morphologie et de nature des parois des spores. D'après l'étude bibliographique réalisée précédemment, l'implication de l'altération de la surface cellulaire dans l'inactivation par l'ozone des spores est une piste très probable. C'est l'hypothèse qui a été retenue dans l'analyse de l'action de l'ozone que présente le chapitre suivant.

II- Action de l’ozone sur la membrane cellulaire des spores fongiques

A- Mesure du degré de peroxydation des phospholipides membranaires

Le(s) mécanisme(s) d’action de l’ozone sur les espèces fongiques reste(nt) incertain(s) et peu d’études ont été menées sur les spores fongiques. S’appuyant sur les données obtenues sur d’autres modèles tels que les bactéries, il est possible d’envisager une détérioration de la surface cellulaire de la spore et notamment une peroxydation des phospholipides membranaires lors de leur contact avec l’ozone.

La quantification du MDA (Malondialdéhyde) résultant de l’oxydation des phospholipides a été un moyen d’investigation. Les graphes de la [Figure 38](#) représentent les concentrations en MDA obtenues en fonction des doses d’ozone appliquées par bullage sur les suspensions de spores de *B.cinerea*, *V.inaequalis* et *N.alba*.

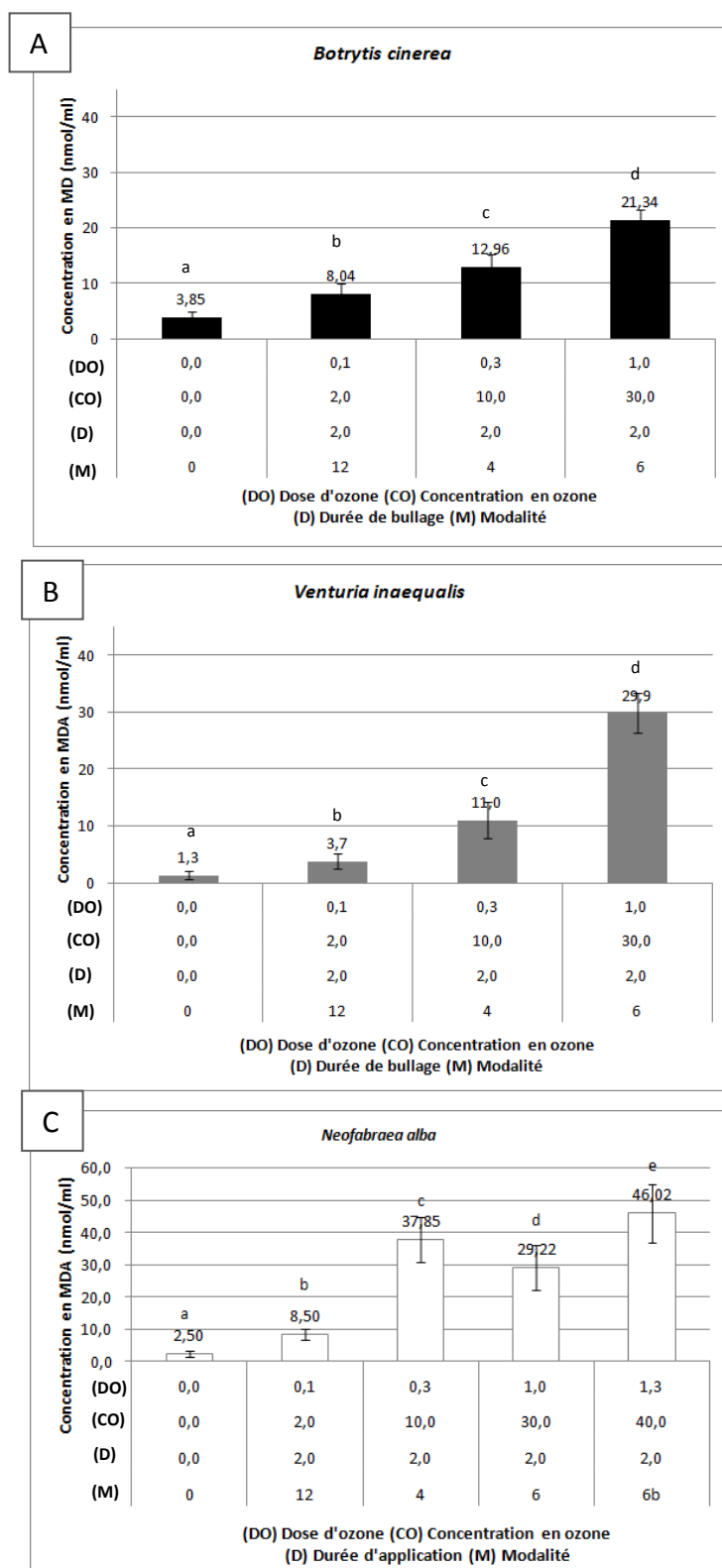


Figure 38 : Concentrations en MDA (en $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$) en fonction de la dose d'ozone appliquée sur les spores de (A) *B.cinerea*, (B) *V.inaequalis* et (C) *N.alba*.

Les modalités sont regroupées en groupes statistiquement différents obtenus par Analyse de Variance. Chaque groupe porte une lettre.

(DO) = Dose d'ozone en $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; (D) = Durée de bullage en minute ; (CO) = Concentration en Ozone dans le gaz entrant (en $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$) et (M) = Modalité.

La concentration en MDA augmente progressivement avec l'élévation des doses en ozone. En ce qui concerne *B.cinerea*, une ozonation à 30 g.m^{-3} pendant deux minutes (modalité 6) augmente significativement la concentration en MDA par rapport aux échantillons témoins, passant de 3,85 à 21,34 nmol/mL de suspension de spores. De même, les échantillons témoins de *V.inaequalis* ont une concentration moyenne en MDA de 1,30 nmole/mL tandis que les échantillons les plus ozonés ont une concentration en MDA de 29,85 nmole/mL. Ces résultats sont en adéquation avec la littérature. Wu et al. (2011) ont montré que l'application de doses d'ozone croissantes sur *Amphidinium sp.* (algue marine) entraînait l'augmentation de la concentration en MDA.

Concernant *N.alba*, le bullage de l'ozone entraîne une production importante de MDA. Pour autant, une diminution de la concentration est à noter entre les modalités 4 et 6, respectivement égales à 37,9 et 29,2 nmol.mL⁻¹. Au-delà de cette dose d'ozone, on constate une nouvelle augmentation de la concentration en MDA produit. Il est possible de faire l'hypothèse qu'à 30 g.m^{-3} (modalité 6), l'ozone s'attaque aux MDA libérés par la peroxydation des phospholipides. Cho et al. (2010) ont observé une concentration en MDA plus grande pour 0,75 log d'inactivation que pour 1 Log d'inactivation, tout comme cela a été enregistré chez *N.alba*. Pour eux, ce pic s'explique par le fait que l'ozone finirait par s'attaquer aux molécules de MDA nouvellement produites. Des doses supérieures en ozone entraîneraient la lyse de la membrane avec libération des composés cellulaires, nouvelles cibles d'attaque de l'ozone. Cela entraînerait une nouvelle production de MDA.

Pour confirmer l'hypothèse que la perte de fonctionnalité de la membrane, liée à la peroxydation des phospholipides, explique l'inactivation des spores, nous avons mis en relation le niveau d'oxydation des phospholipides révélée par le MDA avec le taux de germination des spores (Figure 39).

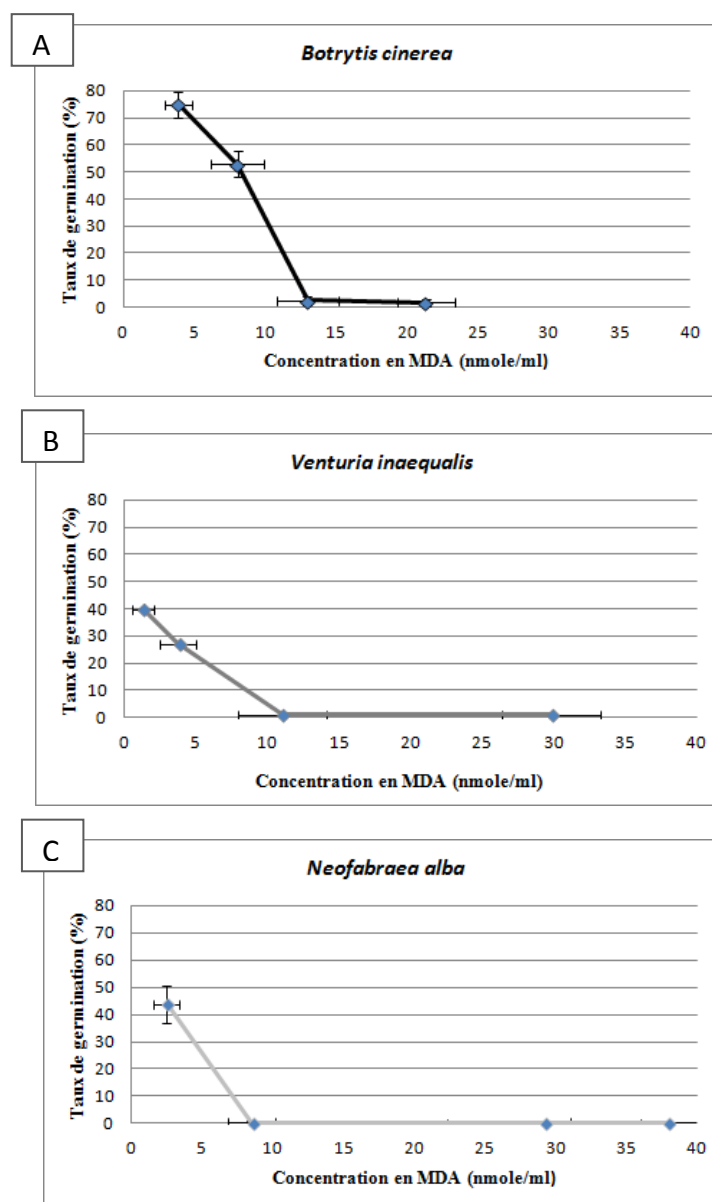


Figure 39 : Taux de germination (en %) des spores de (A) *B.cinerea*, (B) *V.inaequalis* et (C) *N.alba* en fonction de la concentration en MDA produit (en nmol/mL d'échantillons).

Plus la concentration en MDA est importante, plus le taux de germination décroît. En l'absence d'ozone, la concentration en MDA est de l'ordre de 2,5 nmol/mL pour les échantillons témoins de *N.alba*. Le pourcentage de germination est alors de 43,9 %. Quand la quantité de MDA produit augmente, le taux de germination est quasiment nul, de l'ordre de 0,5 % au maximum.

Dans les cas de *B.cinerea* et de *V.inaequalis*, cette logique est également respectée. En effet, les échantillons témoins non-ozonés, et donc encore en mesure de se développer, enregistrent les taux de MDA les plus faibles, respectivement de 3,85 et de 1,3 nmol.mL⁻¹. En

revanche, plus les spores sont ozonées, plus la concentration en MDA augmente et plus le taux de germination décroît.

L'augmentation de la quantité de MDA produit est donc directement corrélée avec l'inactivation des spores. Cela corrobore les résultats présentés par Cho, Kim, Kim, Yoon, & Kim (2010) qui montrent que plus l'inactivation d'*E.coli* est importante, plus la quantité de MDA produit est élevée. La production de MDA serait directement liée à la détérioration de la membrane cellulaire, conduisant à la perte de l'activité respiratoire et finalement à la mort cellulaire.

Dans le cas des trois espèces testées ici, la production de MDA se poursuit même quand les spores ne se développent plus (Figures 39A, 39B et 39C) : les réactions entre l'ozone (ou les radicaux libres) et les composants des spores perdurent même si le stade léthal a été atteint. L'ozonation n'entraîne pas simplement un stress oxydatif engendrant la mise en œuvre de défenses qui pourraient générer du MDA mais il s'agit bien de réactions chimiques oxydatives entre phospholipides et ozone qui aboutissent à la formation de MDA. Pour autant, l'hypothèse d'un stress oxydatif et d'une réponse de la spore avant sa mort ne peut être totalement réfutée. Ong & Ali (2015) ont en effet démontré qu'en réponse à une dose en ozone croissante, le nombre de cellules synthétisant des ROS (Reactive Oxygen Species) augmente. Ces ROS proviendraient de la chaîne respiratoire mitochondriale qui est l'une des sources majeures de ROS endogènes, notamment quand la mitochondrie est endommagée. Toutefois, les comptages opérés ensuite montraient que toutes les spores étaient non-viables. Selon ces auteurs, ce serait le cumul de ROS qui entraînerait des détériorations oxydatives et la mort cellulaire. L'altération de la surface cellulaire pourrait être la première étape et non l'unique à l'origine de l'inactivation cellulaire.

B- Evaluation de la fonctionnalité cellulaire

1) Intégrité cellulaire

Lors de l'application des différentes doses par bullage, des modifications de l'aspect visuel des spores ont été observées au microscope. Les photographies prises lors des essais réalisés sur *V.inaequalis* sont présentées Figure 40.

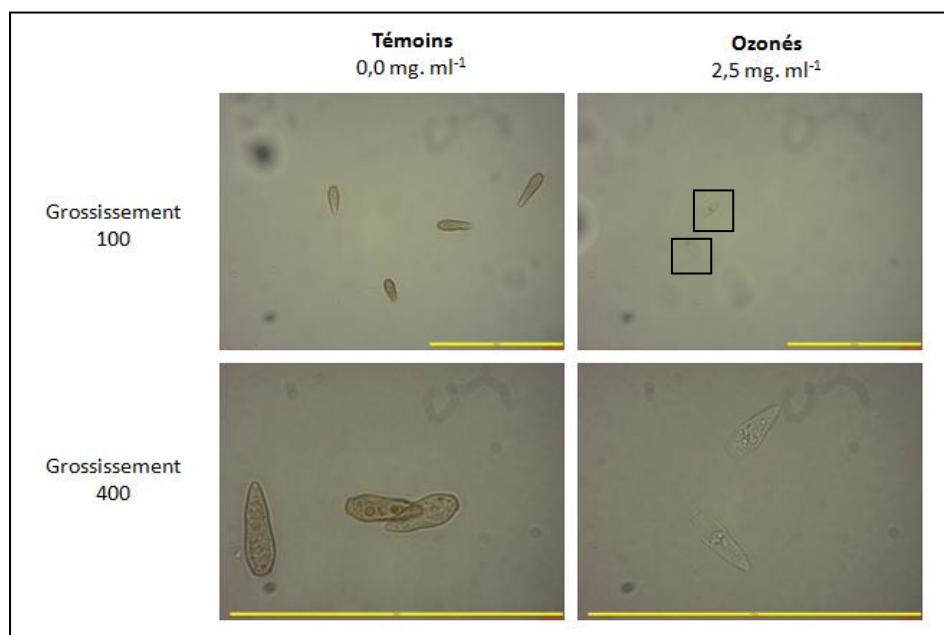


Figure 40 : Observation au Microscope Optique de spores de *V.inaequalis* non-traitées ($DO = 0 \text{ mg.mL}^{-1}$) et traitées ($DO = 2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) à deux grossissements (100 et 400).

Les spores non-traitées présentent une couleur brun-olive, teinte naturelle des conidies de *V.inaequalis*. L'application d'une dose de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'ozone conduit à une perte de cette coloration si caractéristique et les rendent difficiles à observer. En revanche, si des différences visuelles sont enregistrées, il n'y a pas perte de l'intégrité des spores (absence de lyse de la spore). Cette observation corroborent les travaux de Cho et al. (2010) qui constatent également que l'emploi de l'ozone n'entraîne pas de variation dans le nombre de bactéries d'*E.coli* présentes. De même, Pierron et al. (2015) ont démontré que le nombre de spores de *Phaeoacremonium aleophilum* restaient constant après l'application d'eau chargée en ozone. Ils précisent que les spores ont un aspect similaire qu'elles aient ou non été traitées.

L'oxydation des phospholipides de la membrane entraînerait la perte de fonctionnalité de la cellule mais sans nécessairement lyser la spore.

2) Mise en évidence de la perte de fonctionnalité de la spore

Le bleu de Trypan met en évidence la viabilité de la cellule considérée : ce colorant est rejeté par les cellules encore vivantes mais pénètre dans celles qui ne disposent plus d'une barrière membranaire efficace.

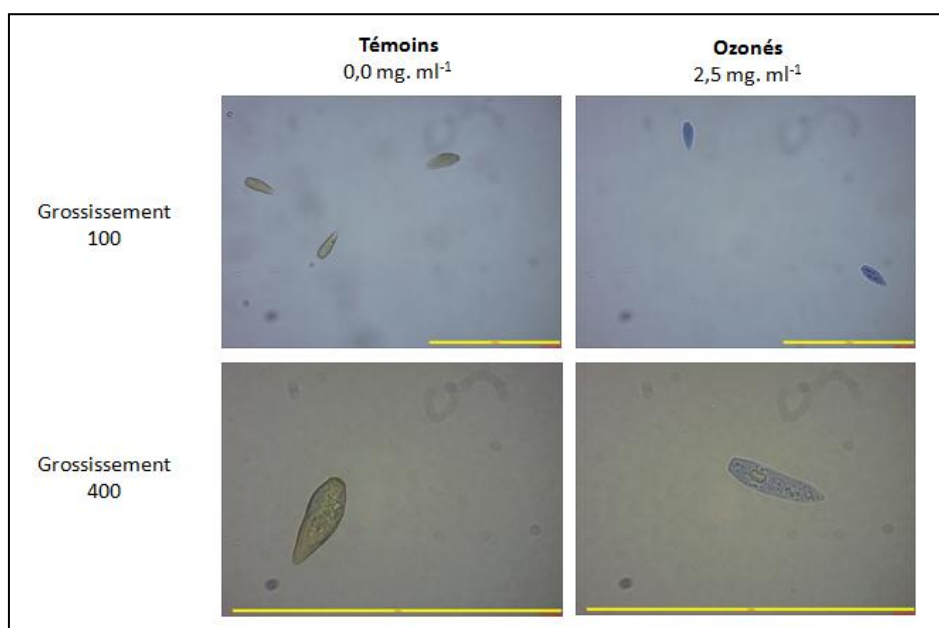


Figure 41 : Observation au Microscope Optique de spores de *V.inaequalis* non-traitées (DO = 0 mg.mL⁻¹) et traitées (DO = 2,5 mg.mL⁻¹) après coloration au bleu de Trypan à deux grossissements (100 et 400).

La Figure 41 rend compte de la modification des spores de *V.inaequalis* après ozonation. Les spores n'ayant pas reçu de traitement sont de couleur brun-olive. En revanche, après application d'ozone, les spores se colorent en bleu. Cela signifie qu'elles ne sont plus en mesure de repousser le colorant. Cette absence d'activité résulte de la mort cellulaire des spores (Strober, 2001). Cela vient corroborer les résultats précédents.

3) Mise en évidence de la désorganisation cellulaire

Le bleu de méthylène permet de mieux visualiser les structures internes de la spore. La Figure 42 présente les photographies de spores de *V.inaequalis*, colorées au bleu de Méthylène avant et après ozonation.

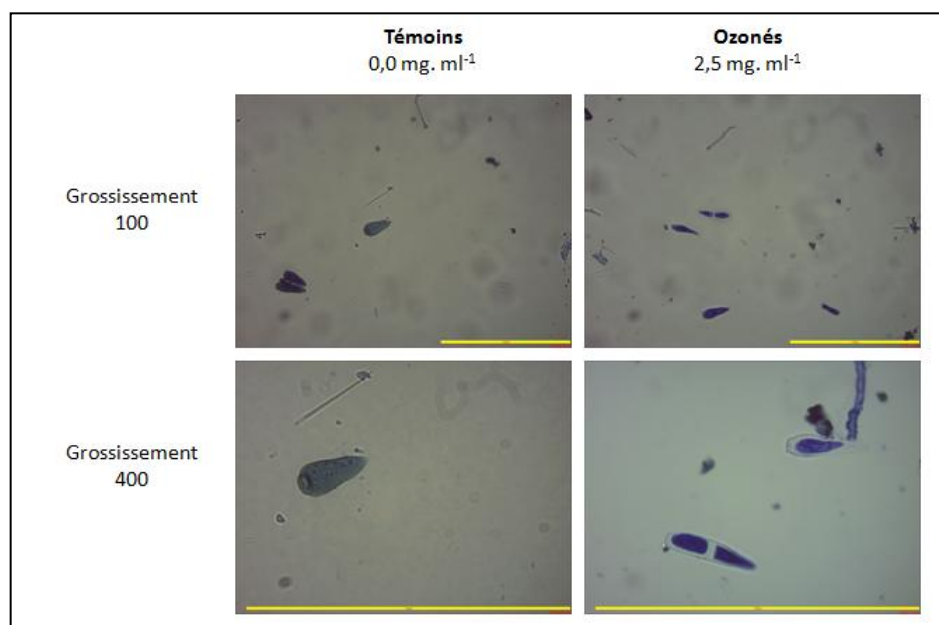


Figure 42 : Observation au Microscope Optique de spores de *V.inaequalis* non-traitées (DO = 0 mg.mL⁻¹) et traitées (DO = 2,5 mg.mL⁻¹) après coloration au bleu de Méthylène à deux grossissements (100 et 400).

Les spores témoins sont intégralement bleues : discerner le cytoplasme de la paroi cellulaire est difficile. En revanche, les spores ayant été soumises à une dose de 2,5 mg.mL⁻¹ laissent apparaître un espace entre la masse cytoplasmique et la paroi. Il semblerait que les spores ozonées voient leur cytoplasme se rétracter. Cette contraction du cytoplasme pourrait résulter d'un phénomène proche d'une plasmolyse. L'ozonation aurait donc conduit à la perte d'eau par la cellule donnant lieu à une rétractation du cytoplasme.

Récemment, Ong & Ali (2015) ont constaté qu'appliquer une dose de 5 µL/L d'ozone gazeux sur les spores de *Colletotichum gloeosporioides* entraîne une désorganisation du cytoplasme et une plasmolyse. Ainsi, les mitochondries retrouvées le sont exclusivement autour de la périphérie cellulaire. En 1962, Scott & Lesher avaient démontré que l'ozone attaquait les acides nucléiques ou leur produit de décomposition après leur libération dans le milieu, ce qui laissait supposer une fuite des composés internes.

C- Confirmation de la modification structurale de la membrane cellulaire

Les images réalisées à l'aide du Microscope Electronique à Balayage témoignent des modifications de la surface des spores. L'utilisation de deux protocoles de dessiccation a permis de mieux mettre en évidence les effets de l'ozone.

➤ Observation des échantillons préparés par déshydratation à température ambiante

La Figure 43 rend compte des modifications de la surface des spores générées par l'ozone. Les séries de photos A et B montrent que les spores non-traitées et faiblement traitées ($DO = 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) ont leurs parois rétractées et moins arrondies que les spores fortement ozonées. Le mode de préparation des spores utilisé ici se caractérisait par une déshydratation à température ambiante. Or, selon Fernandez & Quellard (1998), éliminer l'eau liquide d'échantillons fortement hydratés par évaporation peut entraîner l'effondrement des parois cellulaires suivi de la déformation de la surface de l'objet. Au vu de ces clichés, il est possible de supposer que les spores peu ou pas traitées renfermaient plus d'eau que les spores ozonées.

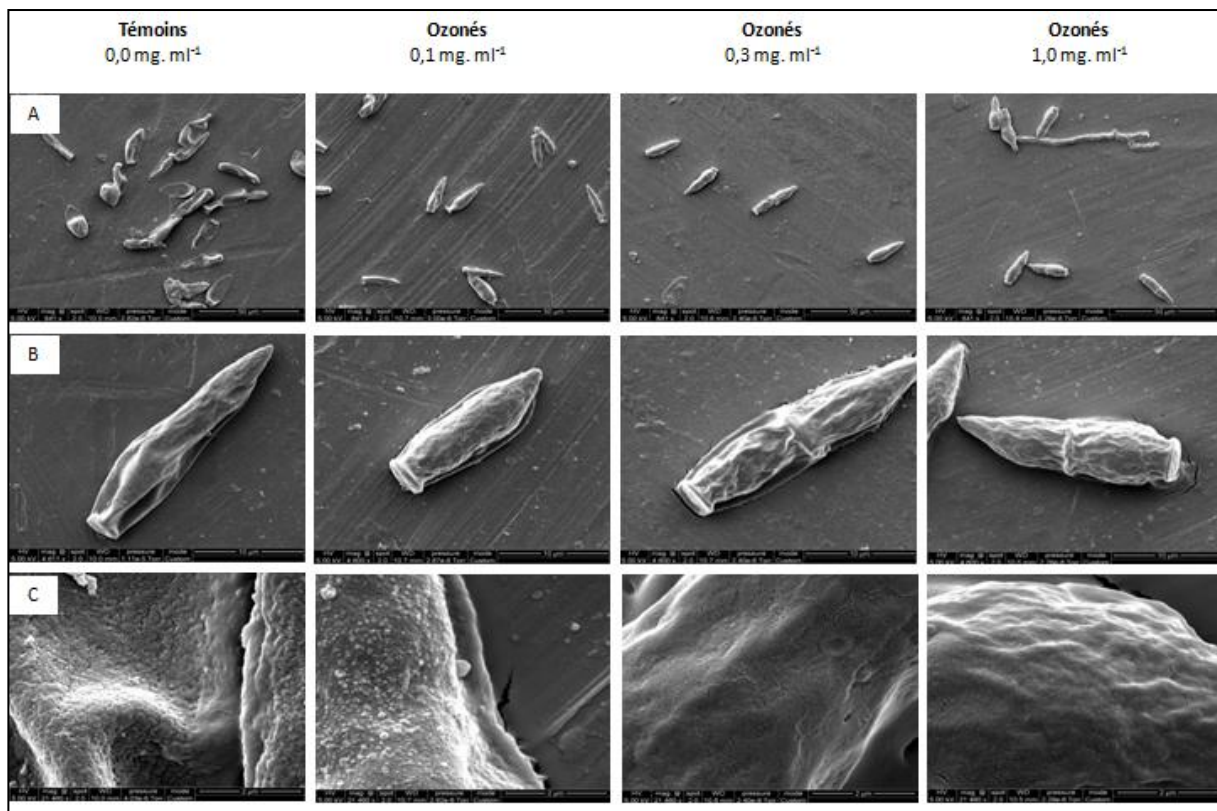


Figure 43 : Observation au Microscope Electronique à Balayage de spores de *V.inaequalis* non-traitées ($DO = 0,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) et traitées ($DO = 0,1 ; 0,3 \text{ et } 1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) à 125 différents grossissements (A= 841, B= 4 600, C= 21 480) (Protocole Déshydratation Température ambiante).

L'altération marquée de la paroi des spores les plus ozonées a très certainement favorisé l'élimination de l'eau de ces dernières. En revanche, les spores peu ou pas ozonées, dont la paroi était donc peu ou pas altérée, n'ont pas perdu la totalité de l'eau intracellulaire durant cette étape de dessiccation. Les mises sous vide lors de la métallisation et lors de l'introduction des échantillons dans le MEB ont conduit à l'élimination de façon brutale de l'eau encore présente. C'est pourquoi, seules les spores témoins et peu ozonées, contenant encore de l'eau, ont subi cette rétraction brutale.

Par ailleurs, en s'appuyant sur les photos de la série B, on constate que, plus la dose d'ozone reçue est importante, plus la paroi fongique est plissée. Enfin, au plus gros grossissement (série C), les spores les plus traitées semblent plus lisses que les spores pas ou peu ozonées. Des structures en forme de « billes » sont visibles sur les parois les moins traitées tandis qu'elles disparaissent sur les parois fortement ozonées. Le traitement à l'ozone a induit une perte d'intégrité ou une déstructuration de la paroi entraînant la libération de ces structures moins bien ancrées.

➤ **Observation des échantillons préparés par dessiccation par contournement du point critique du CO₂**

Dans le premier cas, les spores avaient été déshydratées à température ambiante. Ce séchage avait deux objectifs : stopper le développement fongique et déshydrater les spores. Dans le second procédé, il a été utilisé un fixateur pour immobiliser les structures cellulaires. Il permet également une légère consolidation de la structure de la spore. La dessiccation par contournement du point critique du CO₂, employée dans ce deuxième protocole, entraîne un dessèchement complet sans modification de la forme de l'objet observé. La [Figure 44](#) met en évidence les variations de la topographie de surface suite au traitement avec des doses d'ozone croissantes et à l'application de ce modèle de dessiccation.

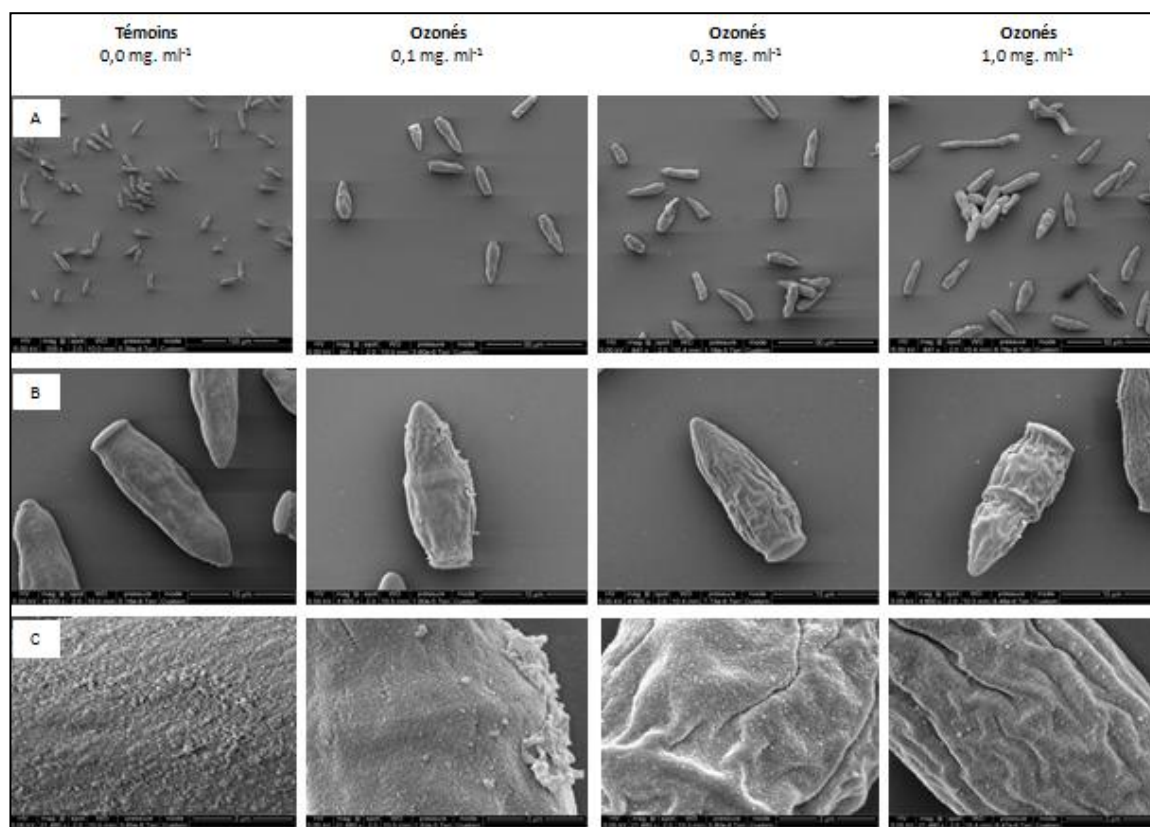


Figure 44 : Observation au Microscope Electronique à Balayage de spores de *V.inaequalis* non-traitées ($DO = 0,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) et traitées ($DO = 0,1$; $0,3$ et $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) à différents grossissements (A= 841, B= 4 600, C= 21 480) (Protocole Point critique).
(La photo des spores témoins de la série A a été prise à un grossissement 335).

Le phénomène de rétraction visible par déshydratation à température ambiante a été éliminé (séries de photographies A et B). La dessiccation par contournement du point critique du CO_2 limite l'effondrement de la structure cellulaire et permet de conserver la forme de la spore.

Les structures rondes qui disparaissaient avec l'accroissement de la sévérité du traitement en ozone lors du précédent protocole sont toujours visibles, même aux doses d'ozone les plus élevées. Le mode de préparation des échantillons est ici moins agressif.

Enfin, les photographies des séries B et C permettent de constater que plus la dose d'ozone est importante, plus le nombre de plis observés sur la paroi est élevé. Le traitement à l'ozone entraîne l'altération de la surface des spores de *V.inaequalis*.

➤ Bilan des observations réalisées par Microscopie Electronique à Balayage

Dans le cas des échantillons ozonés, les structures rondes ont été éliminées lors de la préparation par déshydratation à température ambiante des échantillons. Ces structures pourraient être des glycoprotéines de la paroi des champignons. En effet, la paroi fongique est principalement composée de glucane, chitine et glycoprotéines (Figure 45, Bowman & Free, 2006). Ces différents composés constituent un réseau complexe, formant la structure de base de la paroi. La quantité de protéines présente dans les parois de champignons filamenteux représente approximativement 20 à 30 % de la masse de la paroi. Certaines protéines sont ancrées par des systèmes glycolipidiques appelés GPI (GlycosylPhosphatidylinositol) tandis que d'autres sont directement sécrétées dans les espaces de la paroi.

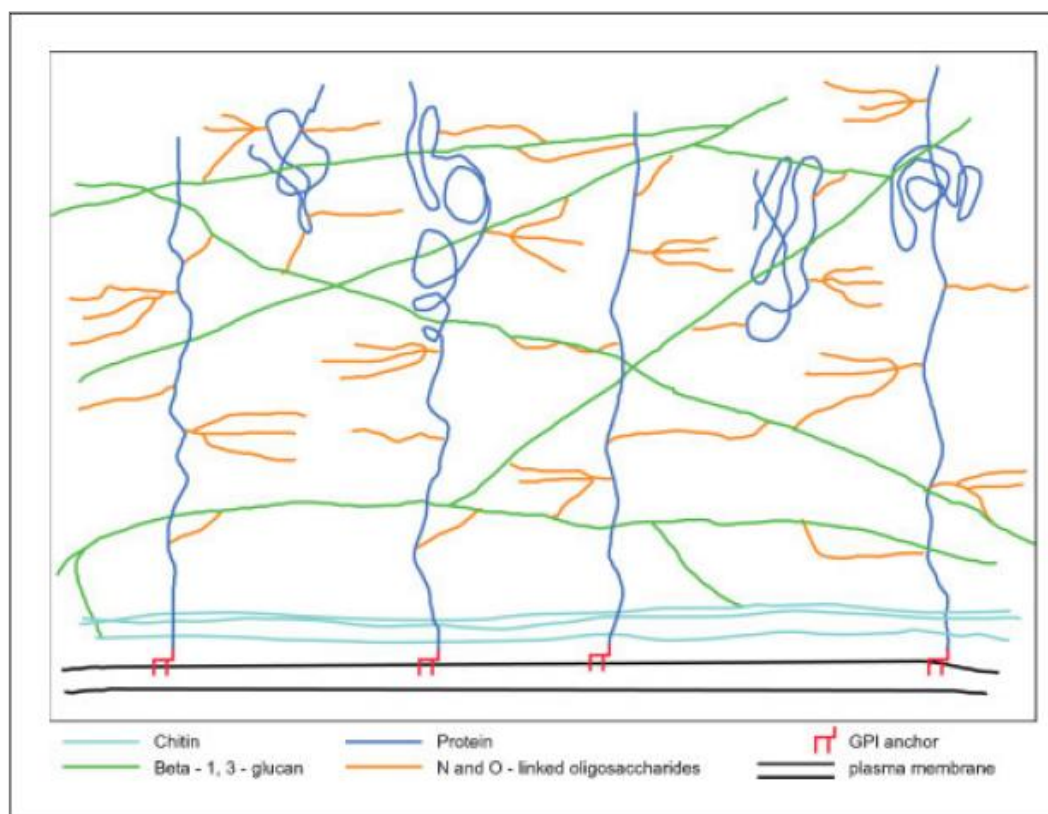


Figure 45 : Représentation de la paroi fongique, extraite de la publication de Bowman & Free (2006).

Par ailleurs, la libération des protéines lors de l'application d'ozone a été démontrée par Cho et al. (2010). Plus l'inactivation d'*E.coli* est importante, plus la quantité de protéines larguées augmente. Les protéines libérées sont ensuite à leur tour attaquées par l'ozone.

Selon ces auteurs, la libération de protéines, constituants majeurs de la barrière cellulaire, prouve la détérioration de la surface cellulaire par l’ozone.

En conséquence, on peut penser que, de part son agressivité, la préparation des échantillons par déshydratation à température ambiante a accentué les phénomènes générés par le traitement à l’ozone.

D’autre part, le second protocole de déshydratation, moins agressif, permet de mieux visualiser l’altération de la paroi. Les images obtenues montrent la présence de plis sur les spores ozonées de *V.inaequalis*. Cette observation est en accord avec la publication de Ran et al. (2010) qui ont appliqué de l’eau ozonée sur les oocystes de *Cryptosporidium*, protozoaire unicellulaire pathogène de l’Homme. Ces œufs encapsulés, qui constitue la forme de résistance du micro-organisme, possèdent une paroi épaisse. Les auteurs constatent à l’aide d’un MEB que la paroi des oocystes non-traités est non-plissée alors qu’un traitement de 60 secondes à l’ozone entraîne des plis sur la paroi. Après 480 secondes, la paroi est complètement détruite et la membrane cellulaire s’est rétractée. Ils concluent que la détérioration de la paroi cellulaire est le témoignage de l’action par contact de l’ozone.

Pour Cho et al. (2010), l’ozone ne pénètre pas de façon efficace dans la cellule (*E.coli*) mais détériore la structure de la paroi. Selon eux, c’est seulement après un certain niveau d’endommagements de la surface que les composés intracellulaires seraient attaqués.

Les observations réalisées suite à la déshydratation à l’air libre sont en cohérence avec cette hypothèse. En effet, les spores ozonées étant moins hydratées, l’effondrement des structures cellulaires, provoqué par la préparation des échantillons et visible sur les spores témoins, a été évité. La paroi, rendue plus perméable sous l’action de l’ozone, a conduit à une perte d’eau et à un séchage intracellulaire plus complet. C’est bien l’altération de la membrane par l’ozone qui est impliquée ici pouvant conduire à un phénomène proche d’une plasmolyse cellulaire comme le montrent les observations au Microscope Optique après coloration au bleu de Méthylène.

D- Conclusions

Cette seconde section avait pour objectifs d'apporter des éléments de réponse concernant les modes d'action de l'ozone sur les spores des champignons ciblés.

Il a tout d'abord été démontré que l'ozonation des spores de *B.cinerea*, *V.inaequalis* et *N.alba* entraînaient l'oxydation des phospholipides membranaires. Cette oxydation est corrélée avec l'inactivation des spores. La détérioration de la surface externe des spores a également été attestée par les observations réalisées à l'aide du MEB. Les clichés ont mis en évidence une altération profonde de la paroi fongique ainsi que la libération très probable d'un de ses constituants majeurs : les glycoprotéines. Des expérimentations supplémentaires de quantification des protéines libérées, qui s'appuieraient sur la méthodologie de Bradford employée par Cho et al. (2010), permettraient de s'assurer de l'identité des structures manquantes sur les spores ozonées et de confirmer cette hypothèse.

D'autre part, il est possible d'envisager un phénomène proche de la plasmolyse suite à l'ozonation. Cela est attesté par les images obtenues après coloration au bleu de Méthylène ainsi que par le protocole par déshydratation à température ambiante mis en place pour les observations au MEB.

Ainsi, au vu de ces résultats et des données bibliographiques, l'ozone entre en contact avec la spore au niveau de sa membrane et commence dès lors à réagir avec elle. Cette réaction entraîne l'altération de la membrane, attestée par l'augmentation de la production de MDA résultant de l'oxydation des doubles liaisons des phospholipides. La structure de la surface cellulaire étant altérée, certains de ces constituants pourraient être libérés telles les glycoprotéines. L'ozone non-consommé s'attaquerait alors aux néo-produits formés tels que le MDA ainsi qu'aux composants nouvellement libérés. L'interaction ozone/spore se poursuivrait par un phénomène proche de la plasmolyse de la cellule.

L'altération de la membrane pourrait être l'unique étape inhibitrice ou la première étape d'une longue série de dégradations cellulaires qui aboutirait finalement à l'inactivation de la spore. Cette question reste en suspens au vu des éléments de la littérature et demanderait des expérimentations supplémentaires (comme le suivi des ROS formées ou encore l'évaluation de l'activité enzymatique inhérente à la prise en charge des ROS).

III- Action de l’ozone sur spores en développement

L’efficacité du traitement sur spores non-germées a été vérifiée. Il est rapporté dans la littérature que l’efficacité de l’ozone peut varier selon le stade de développement du micro-organisme visé (Miller et al., 2013). C’est la raison pour laquelle, les performances de l’eau chargée en ozone sont testées sur des spores en cours de germination de l’un des champignons de l’étude : *V.inaequalis*.

Un suivi de l’évolution des spores de *V.inaequalis* sur 48 heures après dépôt sur cellule de Malassez a tout d’abord été réalisé. La figure suivante (Figure 46) présente les différents stades de germination sur ce laps de temps.

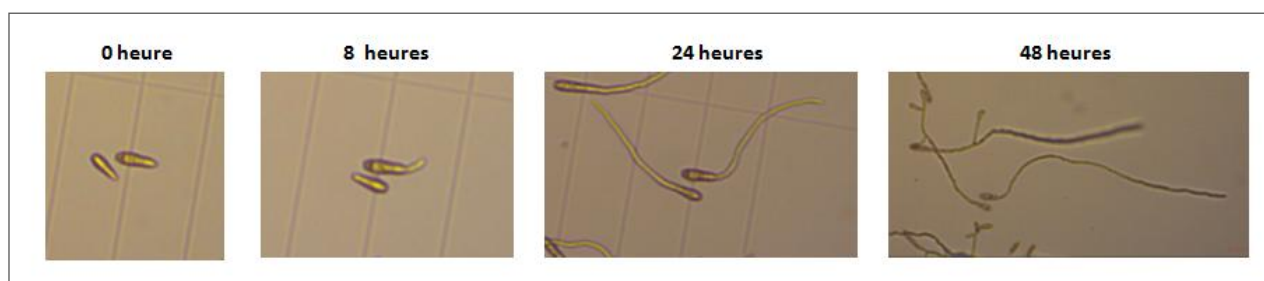


Figure 46 : Observation au Microscope Optique du développement de conidies de *V.inaequalis* à 0, 8, 24 (grossissement 100) et 48 heures (grossissement 40) après dépôt sur cellules de Malassez.

A 0 heure, il est possible d’observer des spores non-germées. Dès la huitième heure, certaines spores commencent à se développer et le tube germinatif apparaît. Ce dernier est clairement développé après 24 heures et commence à se ramifier au bout de 48 heures.

Les 48 premières heures suffisent donc à passer d’une spore non-germée à une conidie présentant un tube germinatif ramifié. Ce suivi confirme l’intérêt de cibler cette période pour la réalisation des tests sur spores en cours de germination.

A- Sensibilité à l’ozone selon le stade de développement

Il a tout d’abord été comparé l’application d’un traitement d’eau non-ozonée et d’eau préalablement chargée en ozone. Les applications ont été réalisées 0, 8, 24 et 48

heures après la mise en culture des spores sur feuilles de cellophane. La codification dans les figures présentant les résultats sera la suivante (Tableau 19).

Codification	Type de traitement		Moment d'application (temps après la mise en culture)			
	Eau non ozonée (Témoins = T)	Eau ozonée (Ozonés = Oz)	0 heure	8 heures	24 heures	48 heures
1T0	✓		✓			
1T8	✓			✓		
1T24	✓				✓	
1T48	✓					✓
1Oz0		✓	✓			
1Oz8		✓		✓		
1Oz24		✓			✓	
1Oz48		✓				✓

Tableau 19 : Codification des différentes modalités (quand le nombre de traitement est égal à 1).

La Figure 47 présente le nombre de spores germées par millilitre de suspensions de spores de *V.inaequalis* après application d'eau ou d'eau chargée préalablement en ozone.

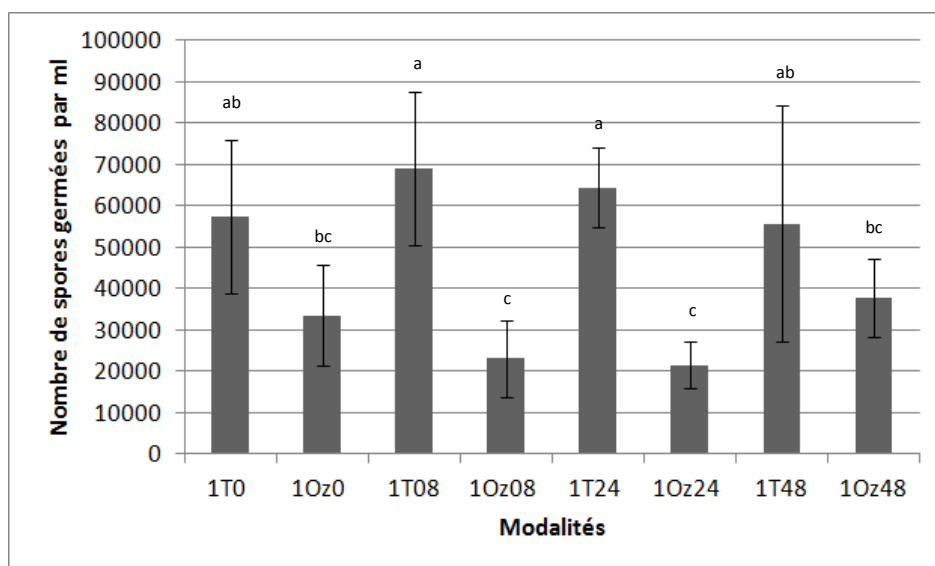


Figure 47 : Effet d'une application d'eau (échantillons T) ou d'eau chargée en ozone (échantillons Oz) sur les spores de *V.inaequalis* (traitement effectué 0, 8, 24 ou 48 heures après la mise en culture).

Les modalités sont regroupées en groupes statistiquement différents obtenus par Analyse de Variance. Chaque groupe porte une lettre.

Lorsque l'application du traitement se fait au moment de la mise en culture, une baisse du nombre de spores germées est enregistrée entre les échantillons traités à l'eau non-ozonée (échantillons 1TO) et ceux ayant reçu de l'eau préalablement chargée en ozone (échantillons 1OzO), comptant respectivement 57 333 et 33 500 spores germées par mL. Cette diminution n'est pour autant pas significative d'un point de vue statistique. En revanche, une réduction significative est visible lors de l'application de l'eau chargée en ozone sur des spores mises en culture depuis 8 et 24 heures. Les nombres de spores germées par mL des échantillons témoins 1T8 et 1T24 s'élèvent respectivement à 69 000 et 64 500 alors que les échantillons ozonés 1Oz8 et 1Oz24 ont un nombre de spores germées trois fois inférieurs (respectivement 23 167 et 21 500 spores germées). Enfin, traiter 48 heures après la mise en culture ne permet pas, dans les conditions expérimentales mises en œuvre ici, de diminuer de façon significative le nombre de spores en mesure de germer.

Ainsi, les spores non-germées et les spores dont le tube germinatif est au contraire le plus développé, sont moins sensibles que les spores ayant un tube germinatif encore très jeune. Les spores en culture depuis 8 à 24 heures semblent en effet plus fragiles.

A 0 heure après inoculation, l'ozone réagit avec une spore possédant une paroi épaisse (Figure 48A). Selon Bowen et al. (2011), les conidies commencent, dans leurs conditions expérimentales, à germer dans les 6 heures après l'inoculation. Les spores se développent alors sur la surface du support sans se ramifier. Entre 6 et 8 heures après inoculation, l'apex du tube germinatif se gonfle et produit un appressorium. Par ailleurs, au vu des photographies réalisées à l'aide du Microscope Optique (Figure 48B), la zone d'élongation du tube germinatif est plus claire : la paroi qui la compose semble plus fine. On peut émettre l'hypothèse qu'elle est plus fragile. L'ozone peut alors agir plus facilement sur ces stades intermédiaires. Selon Bowen et al. (2011), ce n'est qu'entre la 12^{ème} et la 16^{ème} heure que le tube germinatif pénètre dans la cuticule. Ainsi, le tube germinatif ne pénètre que tardivement dans la feuille ce qui explique la fragilité des spores jusqu'à la 24^{ème} heure. Au-delà, la spore est plus difficile à atteindre. En effet, l'ozone agissant par contact, l'efficacité du traitement est limitée quand une partie de la spore développée est protégée par la feuille. D'autre part, plus le mycélium est développé, plus la demande en ozone est importante.

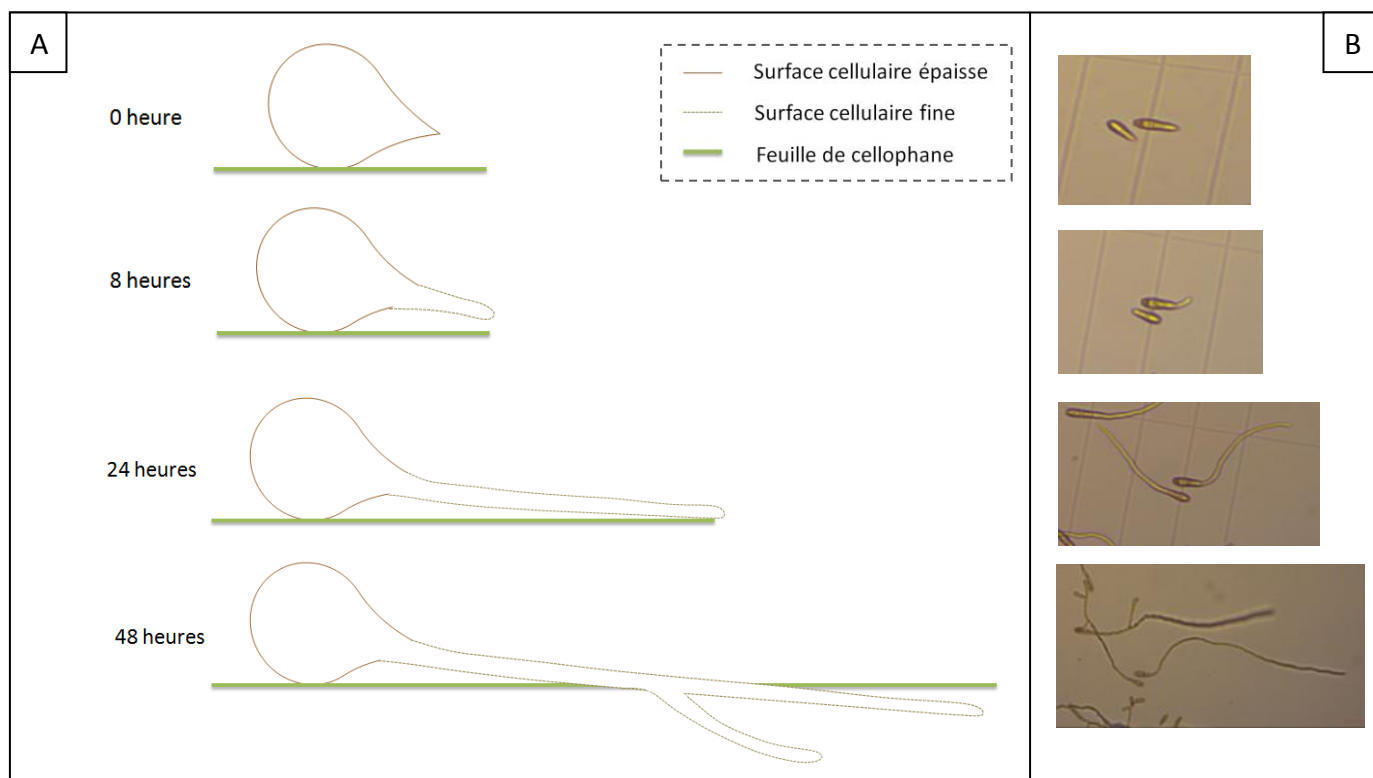


Figure 48 : (A) Développement schématique d'une spore de *V. inaequalis* sur feuille de cellophane entre 0 et 48 heures et (B) Observation au Microscope Optique du développement de spores de *V. inaequalis* à 0, 8, 24 (grossissement 100) et 48 heures (grossissement 40) après dépôt sur cellule de Malassez.

B- Validation du stade de développement optimal d'application de l'ozone

Afin de confirmer l'application potentielle d'un traitement à l'ozone sur le mycélium en développement avant son insertion dans la feuille, nous avons réalisé un second traitement 24 heures après le premier. Les résultats sont présentés [Figure 49](#).

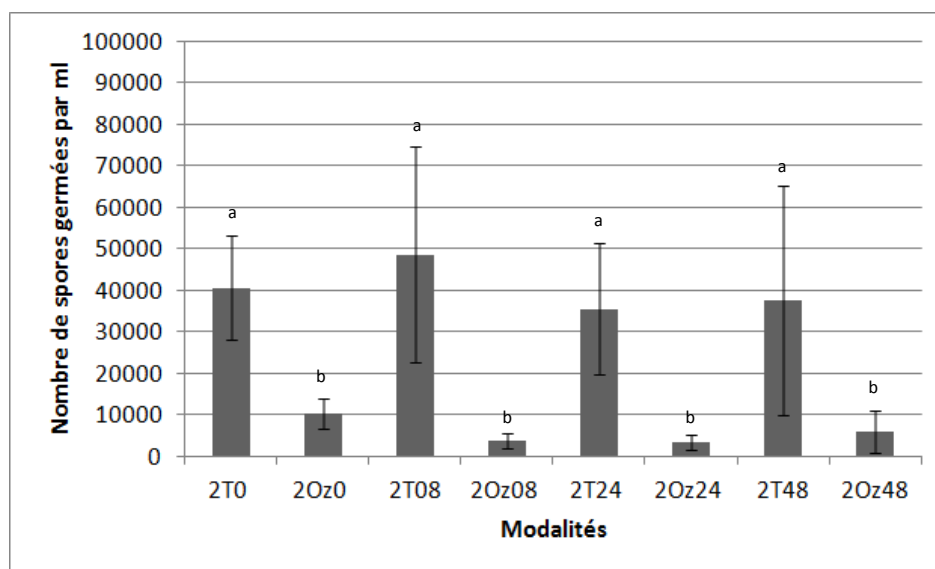


Figure 49 : Effet de deux applications d'eau (échantillons T) ou d'eau chargée en ozone (échantillons Oz) sur les spores de *V.inaequalis* en cours de développement. Les modalités sont regroupées en groupes statistiquement différents obtenus par Analyse de Variance. Chaque groupe porte une lettre.

Les échantillons 2T0 et 2Oz0 comptent respectivement 40 500 et 10 200 spores germées par mL. Cette différence est significative. De même, les échantillons ayant reçu un traitement à base d'ozone 48 heures après la mise en culture puis un second 72 heures après l'inoculation des cellophanes (échantillons 2Oz48), enregistrent un nombre de spores germées significativement différent des témoins (échantillons 2T48). D'autre part, les performances du traitement sont également améliorées pour les modalités intermédiaires.

Ainsi, l'application de deux traitements à intervalle de 24 heures a permis de limiter de façon significative le développement des spores mises en culture.

C- Conclusions

L'objectif des expérimentations réalisées ici était de vérifier l'efficacité de l'eau chargée en ozone sur les spores de *V.inaequalis* à différents stades de développement. L'eau chargée en ozone permet de diminuer le nombre de spots mycéliens de *V.inaequalis*. La fenêtre optimale d'application du premier traitement est comprise entre 8 et 24 heures après l'inoculation (Figure 50).

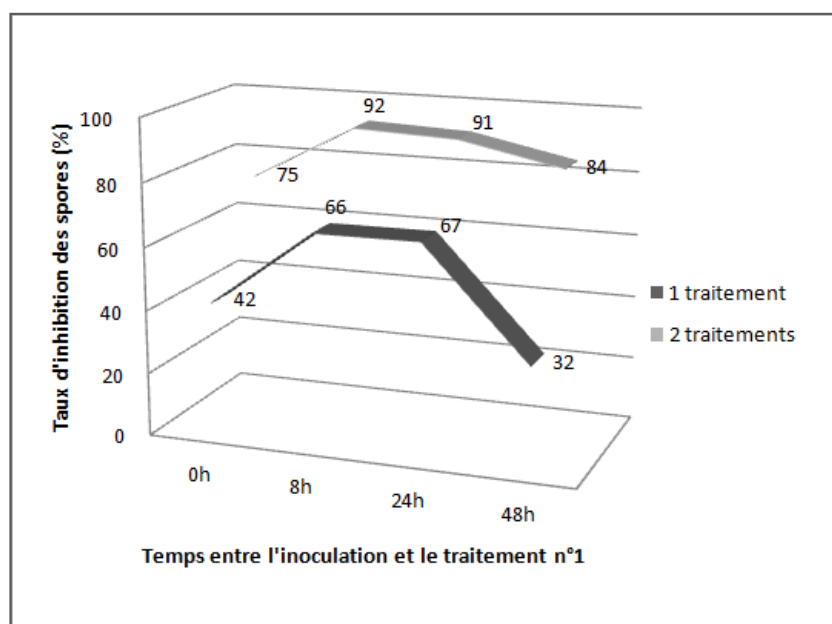


Figure 50 : Taux d'inhibition du développement des spores de *V.inaequalis* en fonction du moment d'application et du nombre de traitements à l'eau chargée en ozone.

En effet, quel que soit le nombre de traitements considéré, les meilleurs taux d'inhibition des spores sont recensés dans cette fenêtre de temps : traiter 8 et 24 heures après mise en culture permet d'atteindre un taux d'inhibition de l'ordre de 67 % avec un traitement et d'environ 92 % avec deux traitements. Les taux d'inhibition sur spores non-germées (traitement immédiatement après mise en culture) et sur spores bien germées (48 heures après l'inoculation) sont plus faibles : inférieurs à 84 % lors de l'application de deux traitements et inférieurs à 42 % après un traitement.

Lors de l'application d'un seul traitement, des différences de réponse ont été observées selon le moment d'application. En effet, les spores non-germées (traitées immédiatement après leur inoculation) et celles ayant un développement mycélien important (ozonées 48 heures après l'inoculation) sont moins sensibles que celles traitées à des temps intermédiaires (8 et 24 heures après mise en culture sur feuilles de cellophane). La spore non-germée est plus solide que les spores développant leur tube germinatif. De même, les spores fortement développées ont une partie de leur tube germinatif protégée par la feuille de cellophane. De plus, leur développement mycélien plus important nécessiterait une dose d'ozone plus élevée pour être efficace.

Par ailleurs, il a été mis en évidence qu'une deuxième application, 24 heures après la première, accroît l'efficacité du traitement. Le taux d'inhibition était compris entre 32 et 66

% après un traitement tandis qu'il se situe entre 75 et 92 % après deux applications. Appliquer deux traitements permet donc d'augmenter les performances du traitement à base d'ozone, même aux stades de développement les moins sensibles. La dose d'ozone entrant en contact avec les surfaces cellulaires des spores est deux fois plus importante. Par ailleurs, la première application, ralentissant le développement des tubes germinatifs, facilite l'action de la seconde application. Même 48 heures après inoculation, la quantité de matériel fongique est moins importante et est certainement plus accessible pour l'agent de contact qu'est l'ozone.

Cette expérimentation a également permis de développer un modèle plus complexe que précédemment. La présence de la feuille de cellophane constitue en effet une source supplémentaire de consommation de l'ozone.

Enfin et même si Kucheryava et al. (2008) ont confirmé par leurs travaux que le développement de *V.inaequalis* sur cellophanes est comparable avec celui qui se déroule sur feuilles de pommiers, il sera testé dans la dernière partie de ce chapitre l'application de l'eau chargée en ozone sur spores se développant sur jeunes plants afin de s'assurer de l'efficacité du traitement dans un environnement encore plus proche de la réalité du verger.

IV- Action de l'ozone *in vivo*

Grâce aux tests *in vitro* et aux expérimentations réalisées sur feuilles de cellophane, nous avons montré l'effet anti-fongique de l'eau chargée en ozone sur les conidies de *V.inaequalis*. L'objectif final du projet dans lequel s'inscrit cette thèse est de traiter des pommiers au verger. Avant d'envisager un transfert sur le terrain, il est nécessaire d'évaluer l'effet anti-fongique de l'eau chargée en ozone sur jeunes plants contaminés par *V.inaequalis* en conditions contrôlées. Comme cela a été prouvé précédemment, l'ozone agit par contact. L'effet anti-fongique de l'ozone est d'autant plus efficace que le nombre de molécules d'ozone sur la feuille inoculée est élevé par rapport à la masse fongique à atteindre. Augmenter la quantité d'ozone demande d'accroître la quantité d'eau ozonée

pulvérisée ou la concentration en ozone dissous initialement dans l'eau. Par ailleurs, le niveau d'humectation des feuilles peut faciliter le développement fongique.

Partant de ces différents constats, cette étude a été divisée en trois parties :

- l'évaluation de l'action de l'eau chargée en ozone sur jeunes plants nouvellement contaminés par les conidies de *V.inaequalis* ;
- l'étude de l'influence de la quantité d'eau apportée lors de l'application de l'eau chargée en ozone sur le développement de la maladie ;
- l'observation de l'effet de l'application renforcée de l'ozone sur le développement de la tavelure sur jeunes pommiers.

A- Validation de l'effet anti-fongique de l'ozone contre les conidies de *V.inaequalis* sur jeunes plants

Suivant le protocole décrit dans le [Tableau 20](#), les jeunes plants de la modalité « Contrôles » ont été uniquement inoculés par les conidies de *V.inaequalis* (échantillons C). Le but est ici de s'assurer que le mode d'inoculation est opérationnel.

Les jeunes plants de la modalité « Contrôles-Mouillant » ont reçu l'inoculum puis la suspension de silice (échantillons C+Si). Le mouillant a pour but de limiter le ruissellement de l'eau sur la feuille et donc de favoriser le contact entre l'ozone et la surface des feuilles. La silice a été choisie du fait de son emploi courant pour cette fonction. La modalité « Contrôles-Mouillant » doit mettre en évidence l'éventuelle influence de la silice.

Les jeunes plants de la modalité « Témoins » ont, en plus de l'inoculum et de l'apport de silice, été traités à l'aide d'eau non-ozonée (échantillons T). Enfin, les plants de la modalité « Ozonés » ont subi les mêmes opérations que les plants Témoins mais ont été traités avec de l'eau chargée préalablement en ozone (échantillons Oz). Pour rappel, la concentration en ozone dissous dans l'eau était de l'ordre de 14,5 mg.mL⁻¹.

Opération	Opération réalisée à :	(1) Contrôles (C)	(2) Contrôles Mouillant (C+Si)	(3) Témoins (T)	(4) Ozonés (Oz)
Inoculation	T + 0 heure	✓	✓	✓	✓
Pulvérisation Mouillant silice	T + 15 heures		✓	✓	✓
Application eau non-ozonée	T + 16 à 21 heures			✓	
Application eau ozonée					✓

Tableau 20 : Caractéristiques des quatre modalités du protocole A (protocole *in vivo* de base).

L'effet des différentes modalités sur le développement de la tavelure est évalué par détermination du pourcentage de surfaces foliaires atteintes par la maladie. Les moyennes des pourcentages de surfaces foliaires atteintes par la maladie présentées Figure 51 résultent de cinq répétitions biologiques. Une répétition biologique correspond au traitement des quatre modalités (« Contrôles », « Contrôles-Mouillant », « Témoins » et « Ozonés »). Chaque modalité est constituée de 8 à 12 plants.

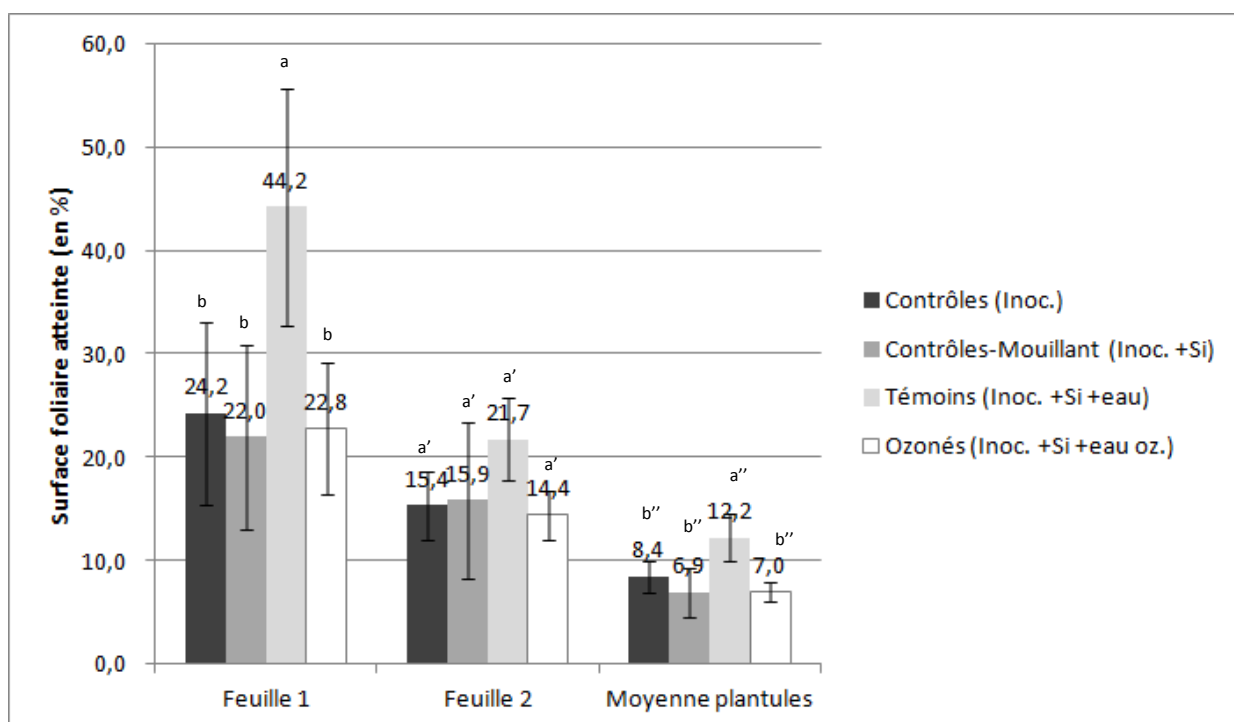


Figure 51 : Niveau d'infection par la tavelure des feuilles 1 et 2 ainsi que de l'ensemble des jeunes plants selon les différentes modalités (protocole A).

(Les barres d'erreur correspondent aux erreurs-types).

Les modalités sont regroupées en groupes statistiquement différents obtenus par Analyse de Variance.

Il a été réalisé une Analyse de Variance pour chaque feuille, indépendamment les unes des autres.

Dans le cas de la modalité « Contrôles », les surfaces foliaires atteintes par la maladie sur les feuilles 1, 2 et l'ensemble des plantules sont compris entre 8 et 24 %. La méthode d'inoculation est donc opérationnelle. Quelle que soit la modalité, le niveau d'infection des feuilles 1 est supérieur à celui des feuilles 2. La feuille 1 est en effet la plus exposée car elle se situe à l'étage foliaire supérieur au moment de l'inoculation.

Pour la modalité « Contrôles-Mouillant », les pourcentages de surfaces foliaires atteintes sont compris entre 7,9 et 22,0 %. Ils ne sont pas significativement différents des pourcentages d'infection de la modalité « Contrôles ». Ce niveau d'infection proche s'explique par la faible différence des quantités d'eau apportées et surtout par la neutralité de la silice. Les jeunes plants traités suivant la modalité « Témoins » ont en moyenne 12,2 à 44,2 % de leurs surfaces foliaires atteintes par la maladie. Ils présentent les pourcentages les plus élevés. Ces pourcentages sont, dans le cas de la feuille 1 et de l'ensemble des plantules, significativement plus importants que les valeurs observées pour les modalités « Contrôles » et « Contrôles-Mouillant ». Cette différence s'explique par un plus grand apport d'eau résultant des cinq pulvérisations post-inoculation d'eau non-ozonée.

Enfin, les jeunes plants de la modalité « Ozonés » ont des pourcentages de surfaces foliaires atteintes compris entre 7 et 22,8 %. Ces taux ne sont pas significativement différents de ceux enregistrés par les modalités « Contrôles » et « Contrôles-Mouillant ». En revanche, ils sont statistiquement différents des taux observés pour la modalité « Témoins » (Figure 52). Ainsi, même si la modalité « Ozonés » reçoit autant d'eau que les jeunes plants de la modalité « Témoins », le niveau d'infection est de l'ordre de celui des échantillons C et C+Si. L'effet de l'apport d'eau qui favorise le développement fongique est compensé par l'effet anti-fongique de l'ozone.

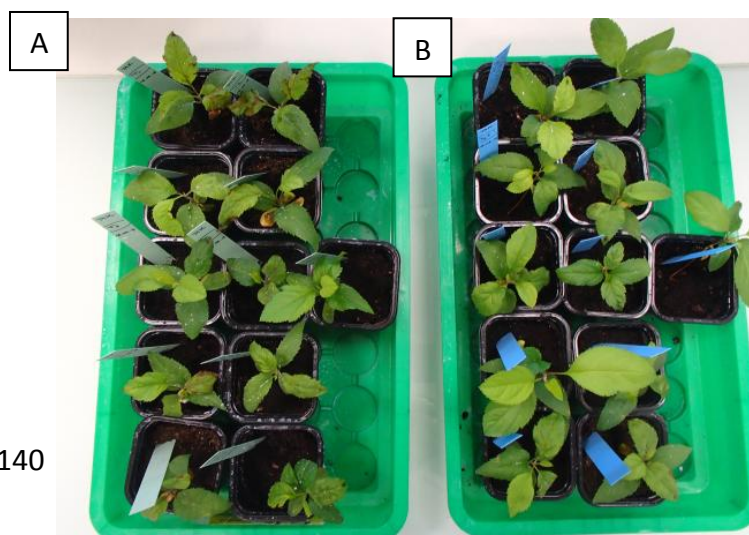


Figure 52 : (A) Modalité « Témoins » et (B) Modalité « Ozonés » (photographie prise trois semaines après inoculation)

Ainsi, la méthode d'inoculation est opérationnelle. Les modalités se différencient par la quantité d'eau et la quantité d'ozone reçues par les plants inoculés.

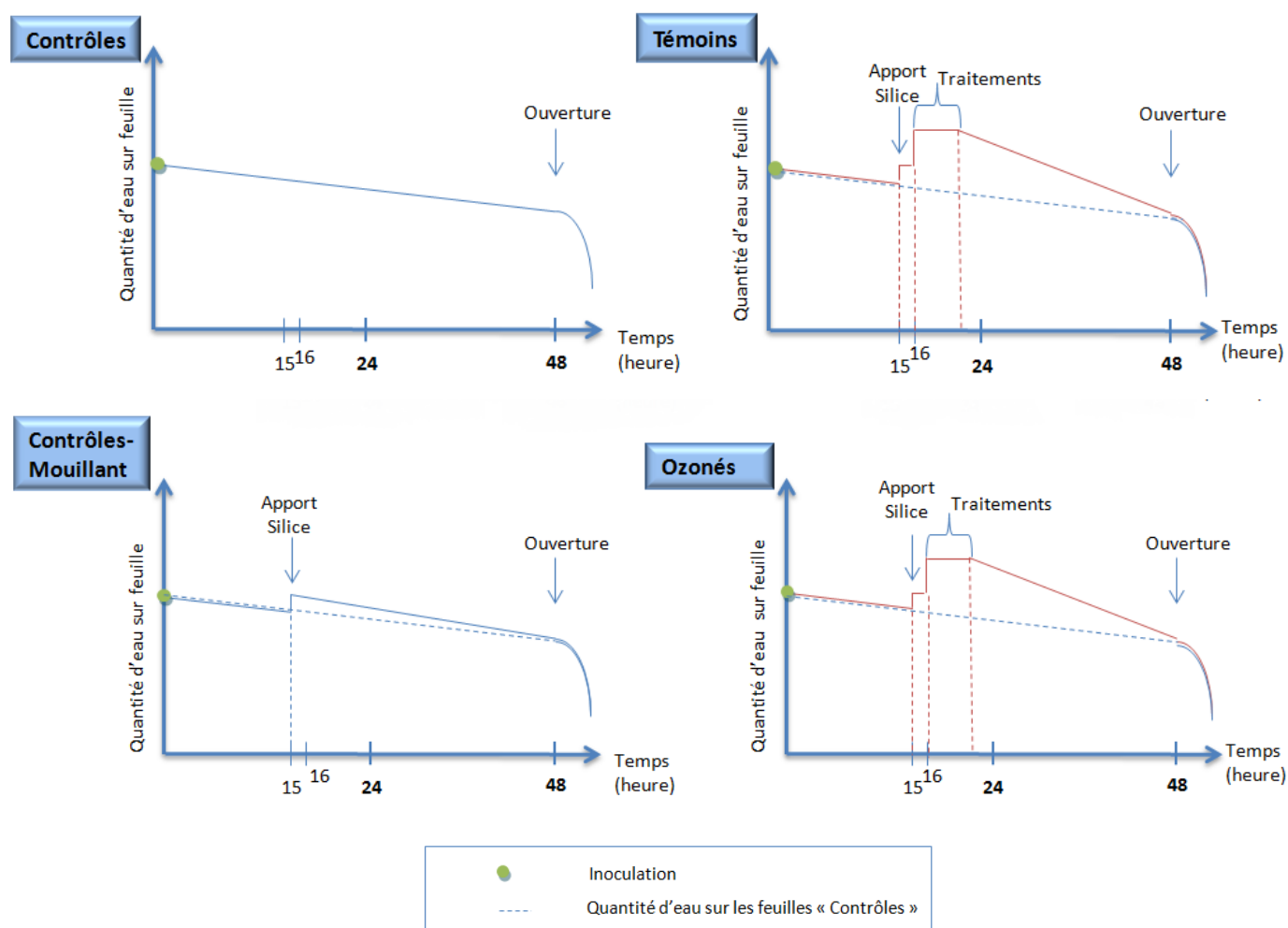


Figure 53 : Evolution théorique de l'eau sur la feuille selon les différentes modalités (Protocole A).

Le mot « ouverture » correspond au retrait des couvercles des serres.

Les jeunes plants des modalités « Contrôles » et « Contrôles-Mouillant » reçoivent une quantité d'eau du même ordre (Figure 53). Ils sont donc comparables. Les pourcentages de surfaces foliaires atteintes par la maladie, observés sur les plants de ces deux modalités, sont équivalents. La silice n'a donc pas d'effet anti-fongique.

La comparaison des modalités « Témoins » et « Ozonés » est possible du fait d'une quantité d'eau équivalente apportée sur feuilles. Les pourcentages de surfaces foliaires atteintes par la maladie observés sur jeunes plants Témoins sont significativement supérieurs à ceux visibles sur les jeunes plants Ozonés. L'eau chargée en ozone a donc un effet anti-fongique sur le développement des conidies de *V.inaequalis* inoculées sur jeunes

plants. Enfin, aucune différence significative n'est observée entre les résultats des jeunes plants « Contrôles » et ceux de la modalité « Ozonés ». Comparativement aux jeunes plants de la modalité « Contrôles », les jeunes plants Ozonés reçoivent cinq pulvérisations supplémentaires lors des applications de l'eau chargée en ozone. L'effet négatif de l'eau, favorisant le développement fongique, est donc compensé par l'effet positif de l'ozone inhibant la germination des spores.

Ainsi, les résultats de la modalité « Ozonés » sont meilleurs que ceux de la modalité « Témoins » mais restent équivalents aux modalités « Contrôles » et « Contrôles-Mouillant ». La différence d'apports d'eau rend difficile les comparaisons entre modalités non-traitées (« Contrôles » et « Contrôles-Mouillant ») et les modalités traitées (« Témoins » et « Ozonés »).

B- Confirmation de l'effet anti-fongique de l'ozone à quantité d'eau comparable

Dans l'optique de confirmer les performances anti-fongique de l'eau chargée en ozone sur les spores de *V.inaequalis* sur jeunes plants, la réalisation d'essais dans des conditions d'apport d'eau équivalentes a été menée. Pour atteindre le même niveau d'apport d'eau et de temps d'humectation, une étape de séchage post-inoculation sur les modalités « Témoins » et « Ozonés » a été introduite dans le protocole (protocole B « Séchage ») présenté dans le [Tableau 21](#).

Etapas	Temps après inoculation	Modalités			
		Contrôle (C)	Contrôle Séchage (C+Sé)	Témoin (T)	Ozonés (Oz)
Inoculation	T + 0h	✓	✓	✓	✓
Maintien humidité	T + 0h à 48h	✓			
Maintien humidité	T + 0h à 1h		✓	✓	✓
Séchage pendant 14h	T + 1h à 15h		✓	✓	✓
Apport Silice	T + 15h			✓	✓
Apports eau non-ozonée	T + 16h à 21h			✓	
Apports eau ozonée	T + 16h à 21h				✓

Tableau 21 : Caractéristiques des quatre modalités du protocole B (protocole « Séchage »).

Ainsi, la modalité « Contrôles » ne reçoit que l'inoculum. Les jeunes plants de la modalité « Contrôles-Séchage » sont inoculés puis la serre qui les renferme est ouverte une heure après. L'objectif est de faire diminuer rapidement la quantité d'eau présente sur les feuilles. La modalité « Témoins » diffère de la première expérimentation par une interruption du maintien de l'humidité de la 2^{ème} à la 15^{ème} heure. Les jeunes plants sont ensuite réhumidifiés lors des traitements avec silice et eau déminéralisée. Il en est de même pour les plants de la modalité « Ozonés ».

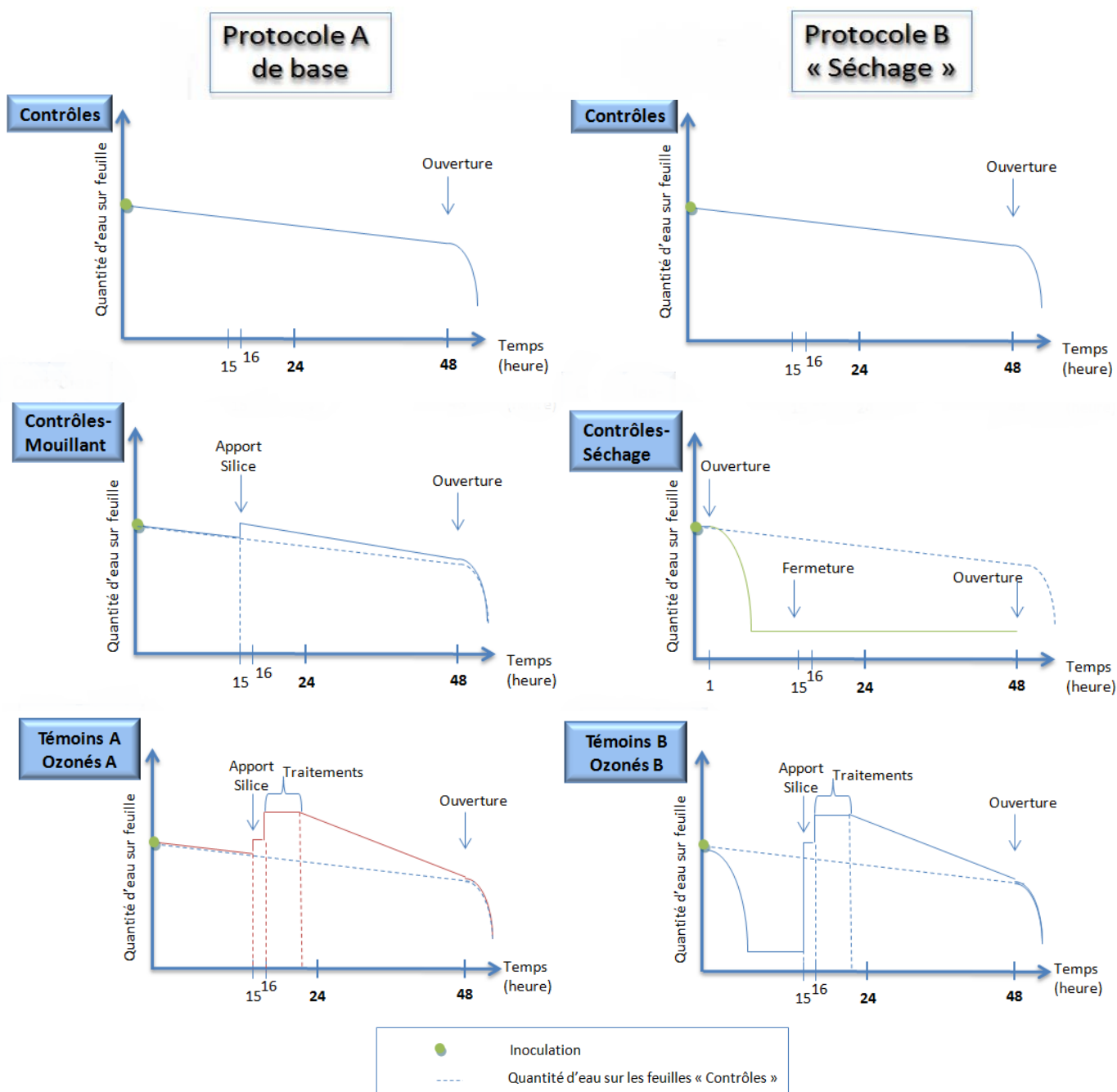


Figure 54 : Evolution théorique de l'eau sur la feuille selon le protocole A de base et le protocole B « Séchage ».

Les mots « ouverture » et « fermeture » correspondent au retrait ou à l'ajout des couvercles des serres.

D'après la [Figure 54](#), la modalité « Contrôle » reste inchangée d'un protocole à l'autre : la quantité d'eau présente sur feuille augmente lors de la pulvérisation de l'inoculum et décroît progressivement jusqu'à l'ouverture de la serre 48 heures après l'inoculation. Comme pour toutes les autres modalités, la diminution de l'humidité de l'atmosphère de la serre est limitée par la pulvérisation d'eau déminéralisée sur les parois des serres de façon régulière. L'objectif est de réduire les risques de séchage. D'un point de vue pratique, les feuilles sont encore partiellement mouillées à l'ouverture : les gouttelettes présentes peuvent être comparées à celles d'une fine rosée.

L'eau est apportée en deux temps sur la modalité « Contrôles-Mouillant ». Le premier correspond à l'inoculation. Le second apport d'eau se fait lors de la pulvérisation de la solution de silice. Après cette seconde pulvérisation, la quantité d'eau présente sur feuille chute progressivement. A l'ouverture de la serre (soit après 48 heures), les feuilles sont totalement recouvertes de fines gouttelettes.

Les échantillons « Contrôles-Séchage » restent humides très peu de temps comparativement aux autres modalités : une heure après l'inoculation, la serre est ouverte ce qui entraîne une diminution rapide de l'humidité. Les feuilles sont totalement sèches en quelques heures. La quantité d'eau totale apportée ainsi que la durée de l'humectation sont donc diminuées. Cette modalité a pour objectif d'évaluer l'importance de la présence d'eau sur les feuilles pour le développement de la maladie.

Les modalités « Témoins » et « Ozonés » du protocole A voyaient la quantité d'eau présente sur feuille augmenter lors de l'inoculation, puis lors de l'apport de silice ainsi qu'à chaque traitement. Le taux d'humidité final sur feuille était donc plus élevé que dans le cas des modalités « Contrôles » et « Contrôles-Mouillant ». Même 48 heures après le début de l'expérience, les feuilles étaient totalement mouillées et portaient encore de grosses gouttes d'eau. Au contraire, dans le protocole B, l'ouverture des serres, qui intervient une heure après l'inoculation, permet en quelques heures de totalement assécher les feuilles. L'apport de silice ainsi que les différentes applications d'eau ou d'eau chargée en ozone entraînent l'augmentation de la quantité d'eau sur feuilles. La durée d'humectation a ici aussi été raccourcie de 15 heures.

Le protocole A favorisait donc la présence d'eau sur les jeunes plants « Témoins » et « Ozonés » (Tableau 22). En revanche, le protocole B permet d'apporter sur les modalités « Contrôles », « Témoins » ou « Ozonés » des quantités d'eau estimées équivalentes.

Protocole	Modalités	Humidité		
		+	++	+++
A (Protocole <i>in vivo de base</i>)	Contrôles		✓	
	Contrôles + Silice		✓	
	Témoins			✓
	Ozonés			✓
B (Protocole « Séchage »)	Contrôles		✓	
	Contrôles + Séchage	✓		
	Témoins		✓	
	Ozonés		✓	

Tableau 22 : Humidité théorique sur feuille en fonction des protocoles et des modalités.

Les résultats de ce second protocole résultent de deux répétitions biologiques (Figure 55).

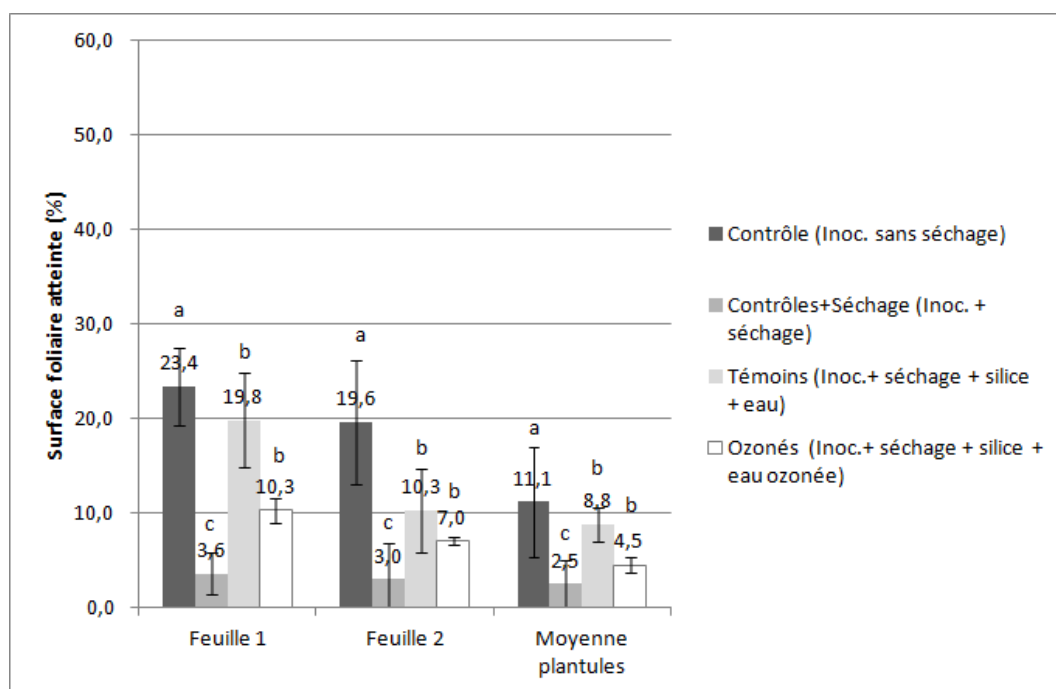


Figure 55 : Niveau d'infection par la tavelure des feuilles 1 et 2 ainsi que de l'ensemble des plantules selon les différentes modalités (protocole B « séchage »).
(Les barres d'erreur correspondent aux erreurs-types).

L'analyse des différences entre les modalités effectuée à l'aide du test de Newman-Keuls avec un risque $\alpha = 0,05$ a été réalisée sur l'ensemble des données (et non feuille par feuille du fait d'un trop faible nombre de répétitions biologiques).

Le niveau d'infection des jeunes plants « Contrôles » est compris entre de 11,1 et 23,4 %. Pour rappel, ces pourcentages étaient compris de 8,4 et 24,2 % pour les jeunes plants « Contrôles » du protocole A : leur similitude rend donc les données issues des deux protocoles comparables.

Le développement de la maladie sur les surfaces foliaires des jeunes plants « Contrôles-Séchage » est inférieur à 4 %. L'absence d'eau sur les feuilles dès la deuxième heure après inoculation limite le développement des spores et donc de la maladie.

Les niveaux de contamination des jeunes plants « Témoins » sont compris entre 8,8 et 19,8 %. Ce niveau d'infection est statistiquement inférieur à celui des plants « Contrôles » mais restent comparables. Les jeunes plants « Contrôles » et « Témoins » ont donc eu des apports d'eau équivalents.

Enfin, les pourcentages de surfaces foliaires atteintes sur les plants « Ozonés » sont compris entre 4,5 et 10,3 %. Ce niveau d'infection est inférieur à ceux observés sur les

plants « Contrôles » et « Témoins » et est supérieur à celui vu sur les plants « Contrôles-Séchage ».

Ainsi, l'eau chargée en ozone présente un effet anti-fongique contre le développement des spores de *V.inaequalis* sur jeunes plants. Les performances de l'eau chargée en ozone observées sur plantules sont moins remarquables que celles vues sur feuilles de cellophane. Dans le cas des expérimentations sur jeunes plants, l'eau chargée en ozone est pulvérisée sur une surface inclinée. L'eau a tendance à ruisseler : le temps de contact ozone/feuille est donc plus faible. Pour limiter ce ruissellement, il a été apporté une suspension de silice, mouillant connu.

D'autre part, la concentration en ozone dissous dans l'eau directement déposée sur feuilles de cellophanes était d'environ 8 mg.mL⁻¹. Dans le cas de la pulvérisation sur jeunes plants contaminés, un phénomène de désorption a été observé lors de l'application de l'eau chargée en ozone. Avant pulvérisation, l'eau ozonée était chargée à la hauteur d'environ 14,5 mg d'ozone par mL. La concentration en ozone après pulvérisation était de l'ordre de 2,6 mg.mL⁻¹. Le déséquilibre qui règne entre liquide, fortement chargée en ozone, et air, quasiment dépourvue d'ozone, favorise les échanges gaz-liquide. Ce phénomène de désorption est donc à prendre en considération lors du calcul des besoins initiaux en ozone dans l'eau de traitement.

Enfin, l'eau, vectrice de l'ozone, favorise le développement fongique. Il sera donc nécessaire de limiter l'apport d'eau lors de l'application d'eau ozonée en vue de réduire la quantité d'eau présente sur la feuille ainsi que la durée d'humectation. Le traitement doit être très concentré en ozone pour limiter les quantités d'eau pulvérisées et rester efficace.

C- Effet de l'application renforcée d'ozone

Lors des tests réalisés sur feuilles de cellophane, il a été mis en évidence l'utilité de l'application d'une seconde série de traitements, 24 heures après la première. Afin de vérifier les performances d'un second traitement, nous avons répété l'application d'eau chargée en ozone sur plantules (protocole C ou protocole « 2 traitements », [Tableau 23](#)).

Opération	Opération réalisée à :	(1) Contrôles (C)	(2) Contrôles Mouillant (C+Si)	(3) Témoins (T)	(4) Ozonés (Oz)
Inoculation	T + 0 heure	✓	✓	✓	✓
Pulvérisation Mouillant	T + 15 et 39 heures		✓	✓	✓
Application eau non- ozonée (Jour 1)	T + 16 à 21 heures			✓	
Application eau ozonée (Jour 1)					✓
Application eau non- ozonée (Jour 2)	T + 40 à 45 heures			✓	
Application eau ozonée (Jour 2)					✓

Tableau 23 : Caractéristiques des quatre modalités du protocole C (protocole « 2 traitements »).

La modalité « Contrôle » reste inchangée : elle ne reçoit que l'inoculum. Après avoir été inoculés, les jeunes plants Témoins et Ozonés reçoivent d'abord un apport de silice puis cinq pulvérisations d'eau ou d'eau chargée en ozone. Silice, eau et eau chargée en ozone sont à nouveau pulvérisées 24 heures après. Afin de s'assurer de l'absence de l'effet du double apport de silice, deux apports de l'agent mouillant sont réalisés sur la modalité « Contrôles-Mouillant ». Le premier est positionné 15 heures après l'inoculation comme cela a été fait jusqu'à présent dans les autres protocoles. Le second apport intervient 24 heures après le premier.

Les pourcentages moyens de surfaces foliaires atteintes par la tavelure résultent de deux répétitions biologiques (Figure 56).

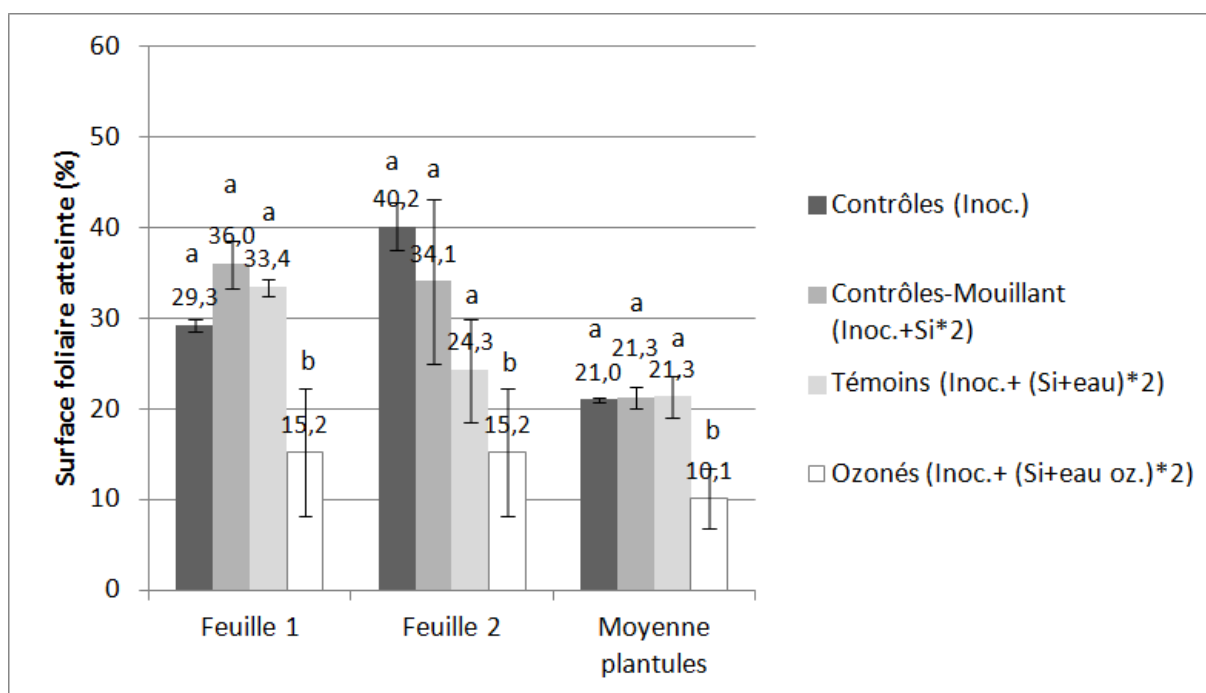


Figure 56 : Niveau d'infection par la tavelure des feuilles 1 et 2 ainsi que de l'ensemble des plantules selon les différentes modalités (protocole C « 2 traitements »).
(Les barres d'erreur correspondent aux erreurs-types).

L'analyse des différences entre les modalités effectuée à l'aide du test de Newman-Keuls avec un risque $\alpha = 0,05$ a été réalisée sur l'ensemble des données (et non feuille par feuille du fait d'un faible nombre de répétitions biologiques)

Les jeunes plants de la modalité « Contrôles » présentent entre 21,0 et 40,2 % de surfaces foliaires atteintes par la maladie. Les jeunes plants traités selon la modalité « Contrôles-Mouillant » sont tavelés à la hauteur de 21,3 à 36,0 % de leurs surfaces foliaires tandis que les plants « Témoins » ont entre 21,3 et 33,00 % de leur surface foliaire malade. Seul le lot « Ozonés » présente un niveau d'infection inférieur à 16 % (Figure 57).

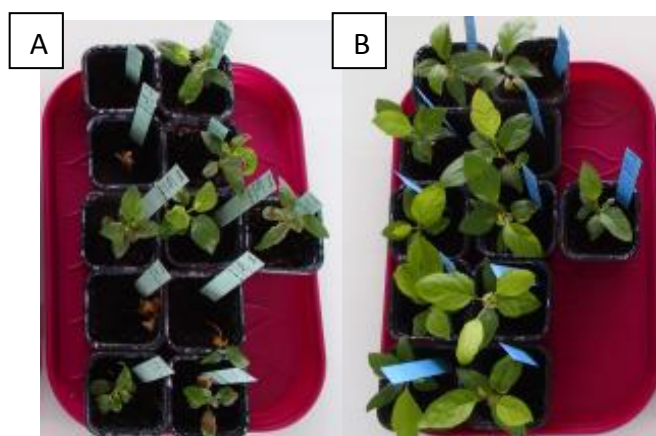


Figure 57 : (A) Modalité « Témoins » et (B) Modalité « Ozonés » (photographie prise trois semaines après inoculation)

L'analyse de différences met en évidence que la modalité « Ozonés » est significativement différente des trois autres modalités. Appliquer deux séries de traitements permet donc de contenir le degré de développement des spores de *V.inaequalis* en-dessous de celui des jeunes plants « Témoins », « Contrôles » et « Contrôles+Mouillant » même lorsque les quantités d'eau apportées sont importantes. Ce protocole se rapprochant du protocole A, il était attendu un niveau d'infection jusqu'à deux fois supérieurs concernant les échantillons « Témoins » par rapport aux lots « Contrôles ». Au contraire, le niveau d'infection est très proche des modalités « Contrôles ». Une interrogation apparaît : est-ce que pulvériser dix traitements au lieu de cinq entraîne un lessivage mécanique ? Enfin, si l'eau chargée en ozone est efficace, l'effet d'un deuxième traitement n'est pas aussi marqué que celui observé sur les feuilles de cellophane. De nouveaux tests mettant en place ce protocole « 2 traitements » seraient donc à envisager pour confirmer ces résultats.

D- Conclusions

1) Effet avéré d'un traitement à l'eau ozonée

L'efficacité de l'application d'eau chargée en ozone par pulvérisation sur jeunes plants de pommiers contaminés par les spores secondaires de *V.inaequalis* a été vérifiée. Appliquer cinq traitements entre la 16^{ème} et la 24^{ème} heure après inoculation des conidies de *V.inaequalis* permet de limiter le degré de surface foliaire atteint par les symptômes de la maladie. L'eau favorise le développement fongique. Etant le vecteur de l'ozone, elle ne peut être supprimée mais sa quantité doit être limitée et optimisée. L'application d'un second traitement 24 heures après le premier améliore les performances du traitement. Les quantités d'ozone apportées semblent suffisantes pour compenser la présence de fortes quantités d'eau sur les feuilles. De plus, en verger, le niveau d'humectation n'est jamais maintenu ainsi longtemps.

2) Influence de la quantité d'eau et de la durée d'humectation

Le premier protocole a mis en évidence que plus la quantité d'eau présente sur la feuille est importante, plus la plante est atteinte par la maladie, excepté en présence d'ozone. L'application d'eau chargée en ozone permet en effet de limiter la germination des spores et de compenser l'effet activateur de la germination induit par la présence de l'eau.

La seconde série d'essais apporte d'autres éléments de compréhension. La différence d'infection observée entre les modalités « Contrôles » et « Contrôles-Séchage » confirme que l'eau est indispensable au développement des spores de *V.inaequalis*. Par ailleurs, la phase de séchage appliquée sur les jeunes plants « Témoins » et « Ozonés » a deux conséquences. D'une part, elle diminue la quantité d'eau totale reçue par la feuille au cours des 48 heures. D'autre part, elle ralentit le développement des spores. L'absence d'eau pendant 15 heures peut en effet limiter l'élongation du tube germinatif. Il en résulte que l'eau chargée en ozone appliquée est par la suite confrontée à des spores moins développées et en reprise de croissance. Ainsi, l'ozone, agent de contact, est face à moins de matériel fongique que dans le cas des premiers essais où les tubes germinatifs étaient plus longs. La demande en ozone par le milieu est donc plus faible.

En conséquence, de faibles quantités d'eau ainsi qu'une durée d'humectation écourtée limiteront le niveau d'infection. Par ailleurs, les performances de l'eau chargée en ozone seront accrues en augmentant la dose d'ozone arrivant sur la feuille. D'autre part, appliquer l'ozone dès les stades les plus précoces limitera la quantité de matériel fongique à traiter et ainsi réduira la demande en ozone tout en s'adressant à un stade de développement mycélien plus sensible. Minimiser la quantité d'eau pulvérisée permettra de ne pas favoriser le développement des spores et de réduire le temps d'humectation.

Un deuxième apport d'eau chargée en ozone, 24 heures après le premier, présente un réel intérêt dans nos conditions expérimentales. Compte tenu de ces résultats, on peut penser que, en verger, il sera nécessaire de maintenir une pression en ozone par plusieurs traitements à l'eau ozonée au lendemain des contaminations.

Chapitre 4 :

Conclusions et perspectives

Face à la question de la faisabilité de l'application d'eau chargée en ozone en verger de pommiers pour abaisser la pression fongique, le travail de thèse s'est structuré en quatre étapes successives. Il s'agissait de valider à chaque phase un élément-clé voire de lever un verrou technique dans le but de garantir l'applicabilité en verger de l'eau chargée en ozone. La validation à chacune de ces étapes a nécessité la maîtrise de techniques spécifiques comme la production de spores fongiques ou d'eau chargée en ozone. De même, nous avons été amenés à mettre au point des méthodes, nouvelles pour notre laboratoire. C'est ainsi qu'il a été développé la technique des « feuilles artificielles » basée sur la feuille de cellophane ou encore de contamination de plants juvéniles de pommier pour les tests *in vivo*.

La progression des étapes a été la suivante :

- 1) Evaluation de l'effet anti-fongique de l'ozone sur les spores des quatre espèces associées aux maladies fongiques du pommier et validation de son effet létal,
- 2) Mise en évidence de l'action oxydative de l'ozone au niveau membranaire et de son impact sur la viabilité des spores,
- 3) Confirmation de l'effet inhibiteur et létal sur spores de *V.inaequalis* en cours de développement,
- 4) Etude de l'effet anti-fongique de l'eau chargée en ozone en conditions contrôlées sur jeunes plants inoculés par les spores de *V.inaequalis*.

I- Confirmation de l'effet anti-fongique de l'ozone sur les spores de champignons pathogènes du pommier

A- Effet anti-fongique de l'ozone sur les spores fongiques

L'effet anti-fongique de l'ozone a été observé sur les spores de *V.inaequalis*, *B.cinerea*, *N.alba* et *P.syringae*.

➤ Importance de la dose d'ozone appliquée

Les essais réalisés par bullage de l'ozone directement dans les suspensions de spores ont permis de mettre en évidence que l'ozone appliqué agit par contact sur les micro-

organismes. Ils ont également montré l'importance de la dose d'ozone dissous dans la suspension. Lorsque les concentrations en ozone dans le gaz vecteur sont élevées, la quantité d'ozone transférée dans l'eau est très importante par rapport aux nombres de spores et est suffisante, quel que soit le temps de bullage, pour inactiver la totalité des spores présentes dans la suspension. Comparativement, lors de l'application de concentrations plus faibles d'ozone, la quantité de molécules d'ozone dissous dans l'eau, susceptible d'inactiver les spores présentes, augmente plus lentement et est faible, pendant les premières minutes. Les molécules d'ozone présentes entrent en contact avec les micro-organismes mais ne sont pas suffisamment nombreuses pour atteindre toutes les structures biologiques de la suspension. L'augmentation du temps de bullage permet d'accroître la dose d'ozone dissous dans la suspension et améliore les performances du traitement.

A doses d'ozone appliquées équivalentes, il faut donc privilégier un grand temps d'application et une faible concentration plutôt que l'inverse. Cette condition est favorable à une quantité d'ozone dissous plus importante grâce à un meilleur transfert de l'ozone dans l'eau.

➤ Effet létal de l'ozone

Compte-tenu des avis divergents présents dans la littérature (Minas et al., 2010; Mylona et al., 2014), l'effet létal de l'ozone a été évalué grâce à un suivi du développement des spores ozonées réalisé sur plusieurs semaines. Il a été démontré que, dans les conditions expérimentales de l'étude, l'inhibition de la germination des spores provoquée par l'ozone est définitive. Cela a été confirmé par l'application du bleu de Trypan sur les spores de *V.inaequalis*. Les spores ozonées ne sont plus en mesure de repousser le colorant. Elles ont perdu leur activité cellulaire. Aux concentrations induisant l'inhibition de la germination, le traitement à l'ozone est donc un traitement létal.

B- Différence de sensibilité entre espèces

Dans des conditions expérimentales comparables, des différences de sensibilité ont été mises en évidence entre les spores de *V.inaequalis*, *B.cinerea* et *N.alba*.

N.alba est l'espèce fongique la plus sensible. Cela peut s'expliquer par les variations de la composition de la surface cellulaire (Alexopoulos et al., 2013) ou encore par des

systèmes de défenses contre le stress oxydatif différents (Antony-Babu & Singleton, 2009). Les différences de taille et de morphologie des spores des trois espèces peuvent également être impliquées. *N.alba* présente des spores particulièrement allongées et étroites : la surface cellulaire globale de la spore est estimée 10 à 14 fois inférieure à celles observées pour les deux autres espèces (Figure 58). La surface globale à oxyder est donc plus faible.

Pour des quantités de spores similaires, la dose nécessaire pour inactiver les spores de *N.alba* sera plus faible. Ainsi, la dose nécessaire pour réduire de 50 % le taux de germination des spores de *N.alba* est de 0,01 mg/mL tandis que les spores de *B.cinerea* et *V.inaequalis* demandent respectivement 0,03 et 0,07 mg/mL.

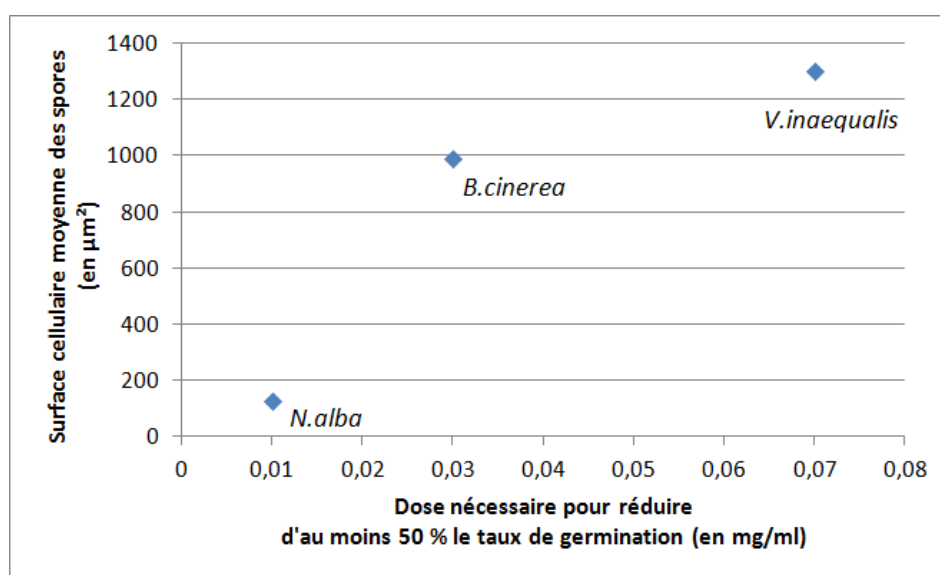


Figure 58 : Dose minimale permettant de réduire d'au moins 50 % le taux de germination en fonction de la surface cellulaire moyenne des spores de chacune des espèces fongiques

Les spores de *N.alba* ont présenté les plus forts taux de production de MDA. Lorsque l'ozone arrive au contact de la spore, il réagit tout d'abord avec les constituants de la paroi avant de parvenir aux phospholipides de la membrane plasmique. Plus la surface cellulaire des spores est faible, plus la surface de la paroi l'est également. L'ozone est donc moins consommé par les constituants de la paroi. Une plus grande quantité de molécules d'ozone peut donc arriver jusqu'aux phospholipides de la membrane, entraînant une production accrue de MDA. De même, la nature de la paroi peut influencer le niveau de consommation de l'ozone par les constituants pariétaux et donc la quantité d'ozone encore en mesure de réagir avec les phospholipides membranaires.

Par ailleurs, pour les doses d'ozone appliquées, seuls les résultats observés pour cette espèce présentaient une augmentation suivie d'une diminution du taux de MDA produit. Ce pic pourrait correspondre à l'oxydation maximale des phospholipides des spores de *N.alba*. Puis, les molécules d'ozone nouvellement apportées sur les spores de *N.alba*, ne pouvant plus réagir avec les phospholipides déjà oxydés, s'attaqueraient ensuite aux molécules de MDA, d'où la chute de la concentration en MDA enregistrée pour la dose d'ozone suivante. Ainsi, la surface cellulaire de la spore est un indicateur de la sensibilité du champignon à l'ozone. La nature de la paroi est un paramètre qui doit également être pris en compte.

C- Effet anti-fongique de l'eau chargée en ozone sur spores en cours de développement

Afin de vérifier l'effet anti-fongique de l'eau chargée en ozone sur des spores en cours de développement, il a été nécessaire de développer un modèle d'étude. Il s'appuie sur l'utilisation de feuilles de cellophane, déjà utilisées comme support dans d'autres études. Ce support permet d'appliquer l'eau chargée en ozone sur des spores à des stades différents de leur développement. Il permet également de renouveler les applications et d'ainsi évaluer l'intérêt de traitements répétés.

Il a été mis en évidence que l'eau chargée en ozone appliquée par submersion a un effet anti-fongique sur les spores en cours de développement. La réponse des conidies de *V.inaequalis* varie en fonction du stade de développement. La spore non-germée est moins sensible à l'eau ozonée que ne le sont les spores ayant débuté leur germination. Dans le cas des spores commençant à germer (jusqu'à 24 heures après l'inoculation), la zone d'élongation du tube germinatif est moins épaisse et n'est pas encore protégée par la feuille de cellophane. La sensibilité à l'ozone est alors la plus importante. Elle décroît à la 48^{ème} heure. Le tube germinatif est alors fortement ramifié, ce qui augmente la surface fongique à traiter et donc la demande en ozone du milieu. Par ailleurs, une grande partie du tube germinatif entre dans la feuille et est donc protégée par cette dernière. Cela confirme ici encore le fait que l'ozone est un agent de contact et non un agent diffusant dans la structure biologique visée. Les ramifications protégées sont rendues inaccessibles aux molécules d'ozone.

Par ailleurs, il a été montré qu'une deuxième application, 24 heures après la première, permettait d'accroître les performances de l'eau chargée en ozone. Les stades les plus résistants, soit la spore non-germée ou celle particulièrement développée, sont alors inhibés de façon significative par rapport aux échantillons témoins.

Cette expérimentation a donc permis de mettre en évidence la fenêtre optimale d'application de l'eau chargée en ozone sur les spores de *V.inaequalis* en cours de germination ainsi que l'intérêt d'un second traitement. Les conidies ont le même comportement sur feuilles de cellophane que sur feuilles de pommier (Kucheryava et al., 2008). Ainsi, le modèle sur feuilles de cellophane a permis d'obtenir des informations précieuses pour le transfert de la technologie en conditions contrôlées.

D- Perspectives

Les méthodologies de production d'eau ozonée ou d'ozonation par bullage employées durant cette thèse pourront à l'avenir être utilisées pour tester l'influence de l'ozone sur de nouvelles espèces (pathogènes ou non du pommier) mais également sur différents matériels fongiques (mycélium *versus* spores) ou souches. Elles pourraient également être utilisées afin de tester divers paramètres (concentrations en ozone, concentrations en spores, temps de bullage, mélange de spores) ou pour évaluer les différences de sensibilité. La colonne de bullage donne enfin la possibilité de récupérer les spores pour réaliser de nouveaux tests suite à l'ozonation, à des fins mécanistiques par exemple (quantification de la production de ROS, mesure de la quantité de protéines libérées, ...).

Le modèle des feuilles de cellophane permet l'application d'eau chargée en ozone sur des spores en cours de développement. Il pourrait être utilisé afin de réaliser des tests complémentaires à ceux effectués durant cette thèse (évaluation de la dose d'ozone minimale efficace, influence du mode d'application (pulvérisation/pipettage), ...). Il pourra également être mis à profit pour tester de nouveaux produits phytosanitaires sur des stades de développement différents et sur de nouvelles espèces fongiques.

II- Implication de l'altération de la membrane dans l'inactivation des spores par l'ozone

A- Peroxydation des phospholipides et perméabilité de la surface cellulaire

L'ozone réagit principalement avec les matières organiques selon le mécanisme de Criegee. Ce mécanisme implique l'ozonolyse des alcènes des chaînes polyinsaturées. L'ozone clive la double liaison covalente entre les deux atomes de carbone. Cette première étape conduit à la production de malondialdéhyde. Le malondialdéhyde résulte notamment de l'action de l'ozone sur les phospholipides membranaires polyinsaturés (Iriti & Faoro, 2008). Sa quantification a permis de mettre en évidence le degré de peroxydation des phospholipides membranaires. Sa concentration augmente dès les premières doses d'ozone, quelle que soit l'espèce fongique. L'ozone provoque donc bien l'oxydation des phospholipides membranaires. L'altération des phospholipides, un des constituants majeurs de la membrane plasmique, entraîne la fragilisation de la surface cellulaire et porte atteinte à sa fluidité. Les tests au bleu de Trypan ont montré que l'ozonation entraînait la perte de fonctionnalité de la membrane cellulaire : elle n'est alors plus en mesure de limiter l'entrée du colorant. Cela confirme donc un défaut dans la perméabilité membranaire. Par ailleurs, les images fournies par le MEB mettent en évidence une paroi plissée et détériorée. Il a également été mis en évidence la perte de structures rondes au niveau de la paroi. Or, il a été rapporté dans plusieurs publications la libération des protéines constitutives de la surface cellulaire (Cho et al., 2010; Khadre et al., 2001; Miller et al., 2013). Il est possible de supposer que les structures éliminées sont des glycoprotéines pariétales.

D'autre part, les tests réalisés à l'aide du bleu de Méthylène ont mis en évidence une rétraction du cytoplasme autour du noyau. Ce phénomène fait penser à une plasmolyse qui résulte par définition d'une sortie d'eau de la cellule. Les images fournies par le MEB viennent conforter cette libération de l'eau intracellulaire. En effet, les spores témoins, séchées à l'air libre, ont vu leur structure s'effondrer car initialement trop hydratées. Les spores ozonées, préparées de façon identique, n'ont pas subi cette rétraction. Elles étaient donc probablement déjà moins hydratées. Ainsi, seules les spores ozonées ont montré un phénomène de rétraction cytoplasmique sur les images obtenues après coloration des spores au bleu de Méthylène et semblent être les moins hydratées sur les images de MEB.

L'hypothèse d'un phénomène proche d'une plasmolyse ne peut donc pas être exclue et se justifie.

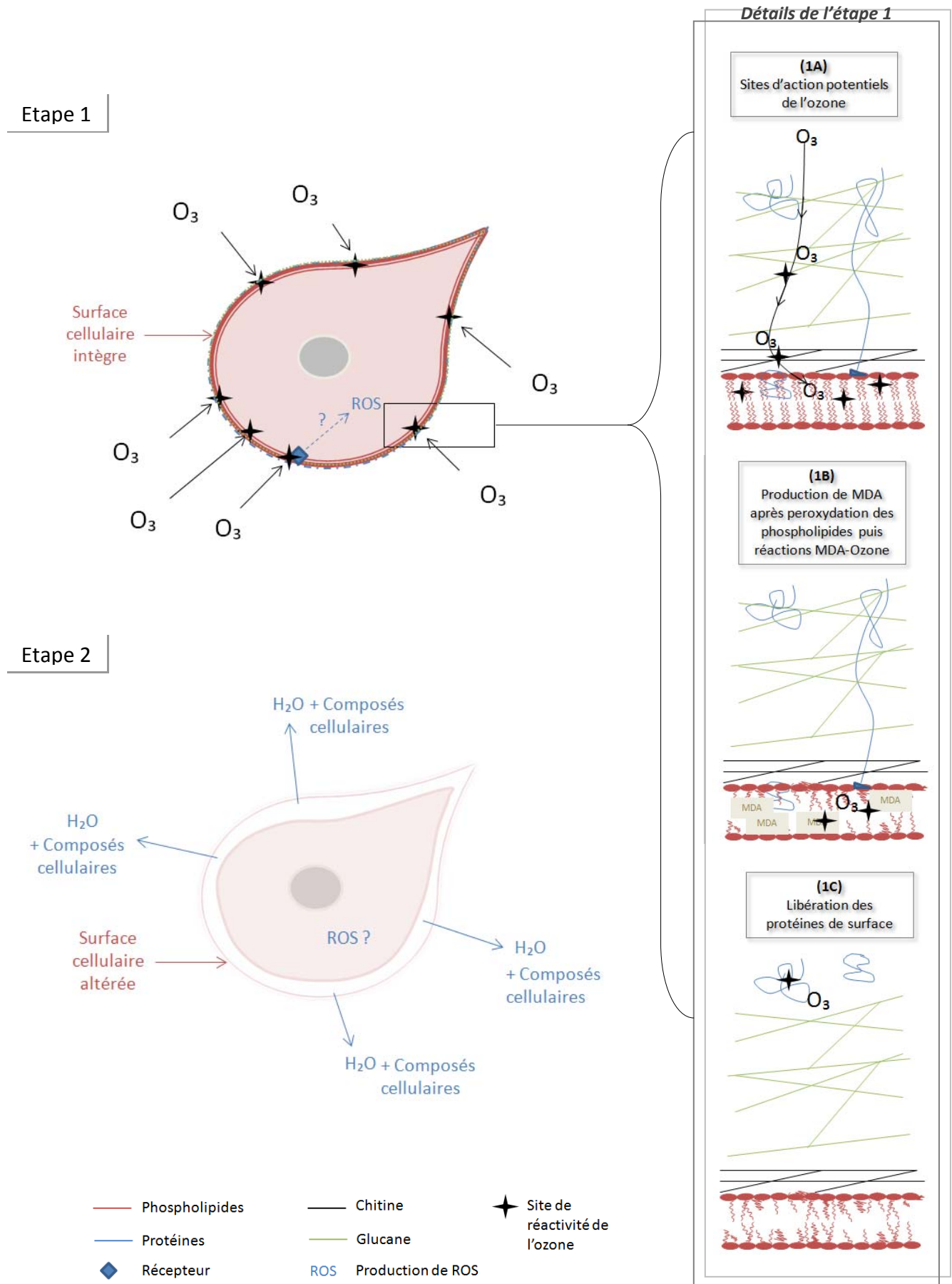
Enfin, la concentration de MDA observée lors de l'ozonation des spores de *N.alba* montrent trois phases : une augmentation du taux de MDA suivie d'une diminution significative avant une nouvelle hausse. Ainsi, l'oxydation des phospholipides, étape productrice de MDA, serait suivie par la dégradation par l'ozone du MDA. Cho et al (2010) font la même conclusion. La remontée du taux de MDA observée sur les échantillons de *N.alba* pourrait se justifier par l'arrivée dans le milieu de composés intracellulaires fraîchement rejetés par la cellule à la paroi altérée ou par l'attaque des acides aminés des protéines membranaires (Iriti & Faoro, 2008; Komanapalli & Lau, 1996).

B- Proposition du mécanisme d'action de l'ozone sur les spores fongiques

L'ozone serait donc un agent de contact, considéré comme étant trop réactif pour pénétrer profondément dans les tissus (Pryor, 1992). La molécule ne diffuse pas dans la spore mais s'attaque directement à la surface cellulaire (Figure 59, étape 1). L'arrivée de l'ozone pourrait en revanche donner lieu à la production de ROS au cœur de la cellule via l'activation de récepteurs membranaires.

Lors de son arrivée au contact de la spore, l'ozone réagit avec les constituants de la paroi puis avec les phospholipides de la membrane plasmique (étape 1A). L'oxydation des phospholipides entraîne la désorganisation de la membrane et la production de MDA. L'ozone s'attaque ensuite aux molécules de MDA nouvelles formées (étape 1B) puis aux protéines de surface libérées (étape 1C). La surface cellulaire a alors perdu sa perméabilité et sa fonctionnalité (Figure 59, étape 2). La cellule se vide de son cytosol.

L'inactivation cellulaire pourrait intervenir soit très précocement dès la peroxydation des phospholipides, soit après l'accumulation de ROS dans la cellule ou suite à la perte du contenu cellulaire. Pour certains auteurs, l'altération de la surface cellulaire suffit à inactiver les micro-organismes (Cho et al., 2010; Scott & Leshner, 1962). Pour d'autres, cette altération n'est qu'une étape avant une série de réactions dans la cellule (Makky et al., 2011; Miller et al., 2013).



C- Perspectives

Des expériences complémentaires permettraient de comprendre l'étape à laquelle intervient la mort cellulaire. Dans le cas de *B.cinerea* et *V.inaequalis*, les doses en ozone les plus faibles (avec des temps d'application courts) n'engendrent pas de mortalité. A l'instar de Komanapalli & Lau (1996), quantifier le MDA produit à ces doses permettrait de voir si il y a peroxydation des phospholipides sans inactivation. Toujours pour des doses en ozone faibles ou intermédiaires, un suivi de la quantité de ROS (Reactive Oxygen Species) intracellulaires mis en parallèle avec l'inactivation cellulaire permettrait d'observer les conséquences de l'arrivée de l'ozone sur la paroi et de voir qui de l'ozone ou des ROS provoquent la mort cellulaire. Enfin, des tests enzymatiques sur l'activité d'enzymes responsables de la prise en charge des ROS (Superoxide Dismutase, NADPH oxydase,...) ou encore une quantification moléculaire des gènes de défenses de la spore pourraient être envisagées.

III- Limitation du développement fongique par l'application d'eau chargée en ozone en conditions contrôlées en vue du transfert en verger

A- Influence des quantités d'eau et d'ozone

L'efficacité de l'eau chargée en ozone appliquée par spray sur jeunes plants de pommiers contaminés par les conidies de *V.inaequalis* a été confirmée.

Il a été observé l'importance de l'humectation des feuilles. L'eau sur la surface foliaire est propice au développement fongique. Etant le vecteur de l'ozone, l'eau ne peut être supprimée mais les quantités pulvérisées doivent être maîtrisées et minimisées. Enfin, l'application d'un second traitement, 24 heures après le premier, augmente les performances de l'eau chargée en ozone et semble compenser une humectation importante sur les feuilles.

B- Phénomène de désorption

L'amélioration des performances de l'eau chargée en ozone demande d'augmenter les quantités d'ozone entrant en contact avec les spores. D'après les résultats obtenus sur jeunes plants contaminés, augmenter les quantités d'eau chargée en ozone apportées sur la feuille favorise l'humectation et donc le développement fongique. La deuxième possibilité est d'accroître la quantité d'ozone arrivant sur la surface de la feuille sans augmenter la quantité d'eau employée. Des mesures de concentrations de l'ozone dissous dans l'eau avant et après pulvérisation ont montré qu'une grande partie de l'ozone dissous était désorbée et diffusait dans l'air au cours de la pulvérisation. La goutte d'eau chargée en ozone est mise sous pression puis pulvérisée dans l'air. L'absence quasi-totale d'ozone dans l'air crée un déséquilibre au niveau de l'interface gaz-liquide. L'ozone est fortement désorbé de la goutte d'eau. La quantité finale d'ozone encore présente dans l'eau lorsque la goutte parvient sur la feuille est considérablement réduite. Selon Fujiwara & Fujii (2004), la taille de la gouttelette et la distance entre pulvérisateur et surface cible sont les deux paramètres les plus influents sur la désorption de l'ozone dans l'air. Pour ces auteurs, plus les gouttes sont fines, plus les pertes en ozone sont importantes. Par ailleurs, la désorption est d'autant plus importante que la distance entre pulvérisateur et surface-cible est élevée.

Un prototype capable de produire et de pulvériser de l'eau chargée en ozone a été développé durant cette thèse. Ce prototype est notamment doté d'un concentrateur d'oxygène permettant d'éliminer les Composés Organiques Volatiles (COV), l'azote, l'humidité et de produire de l'oxygène (pureté de 85 %) à partir de l'air ambiant. Un ozoneur transforme dans un second temps l'oxygène en ozone. L'ozone est enfin injecté dans l'eau grâce à un injecteur Venturi.

Grâce à ce prototype, des tests ont été réalisés en verger sur pommiers. L'eau ou l'eau chargée en ozone étaient appliquées dans les 24 heures suivant la pluie. Aucune différence significative n'a été notée entre les arbres témoins et ozonés. L'eau chargée en ozone était, ici aussi, pulvérisée. Les difficultés liées à la désorption de l'ozone rencontrées en conditions contrôlées ont été certainement mises en exergue en verger. La quantité d'eau apportée était trop importante tandis que la dose d'ozone appliquée était trop faible.

Par ailleurs, il ne peut être exclu une différence de sensibilité entre les ascospores traitées sur le terrain et les conidies utilisées pour les tests réalisés en conditions contrôlées.

Une étude des phénomènes de désorption a été réalisée afin de mieux comprendre et maîtriser ce problème. Ce travail a été effectué en partenariat avec l'INSA (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INSA UMR INSA/CNRS 5504 – UMR INSA/INRA 792). Différents types de buses ont été choisis variant par leur technologie (buse à injection d'air, à fente classique ou à jet plat) et la taille des gouttelettes émises. En fonction de la taille des gouttelettes et de leur vitesse, un modèle de prédiction du phénomène de désorption au cours du trajet entre pulvérisateur et surface-cible a été développé. Des tests expérimentaux ont été réalisés afin de valider le modèle.

Le taux de désorption a été mesuré pour trois buses en augmentant la distance entre la buse et la surface réceptionnant le liquide (Figure 60). A la sortie de la buse, les pertes d'ozone sont comprises entre 60 et 80 % selon les buses. Ce taux est de 80 % quand le diamètre moyen des gouttelettes est de 0,33 mm et est légèrement supérieur à 60 % quand le diamètre moyen est de 1,31 mm. Au bout de 80 cm, l'eau est totalement dépourvue d'ozone. Ces résultats confirment ceux de Fujiwara & Fujii (2004).

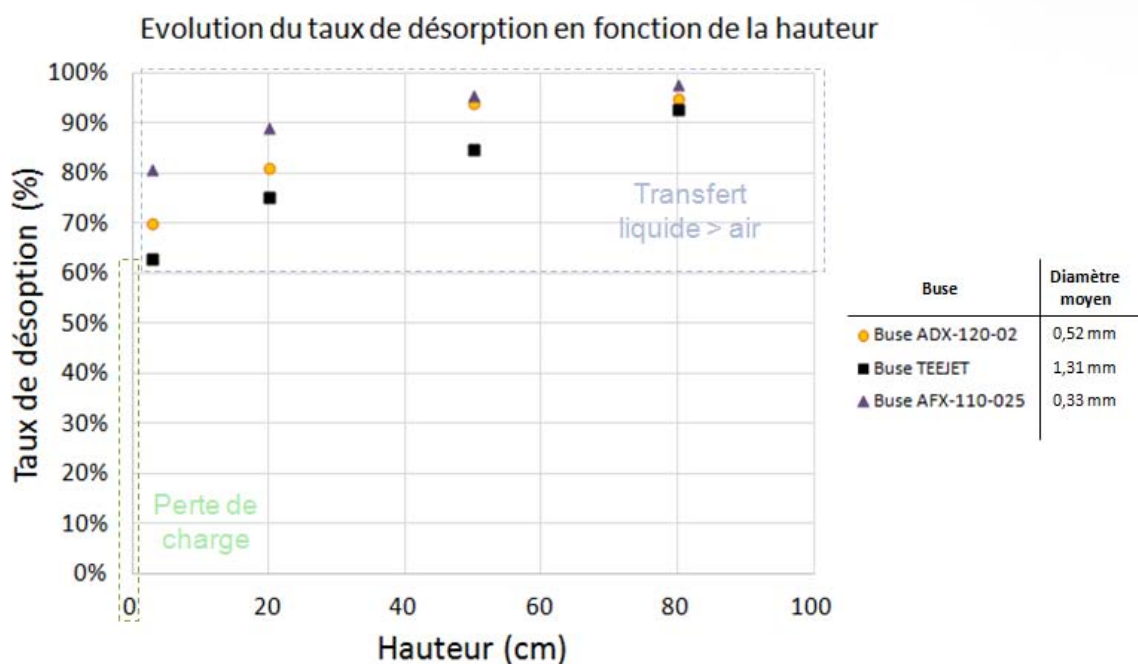


Figure 60 : Taux de désorption de l'ozone en fonction de la distance parcourue et de la buse (EI PURPAN – LISBP INSA)

Le phénomène de désorption se produit donc en deux temps : à la sortie de la buse et au cours du trajet entre buse et surface-cible. Le liquide mis sous pression dans la buse se détend à sa sortie. En second lieu, la désorption se produit durant le temps de vol de la gouttelette.

Il a également été étudié l'évolution du taux de désorption en fonction de la pression (en maintenant la distance entre buse et surface-cible à 5 cm) (Figure 61). Le taux de désorption de la buse Teejet est de 36 % à une pression de 0,2 bar et de 63 % à 1 bar. De même, le taux de désorption de la buse ADX-120-02 augmente avec l'accroissement de la pression, passant de 49 % pour 0,6 bar à 69 % pour 1,4 bar.

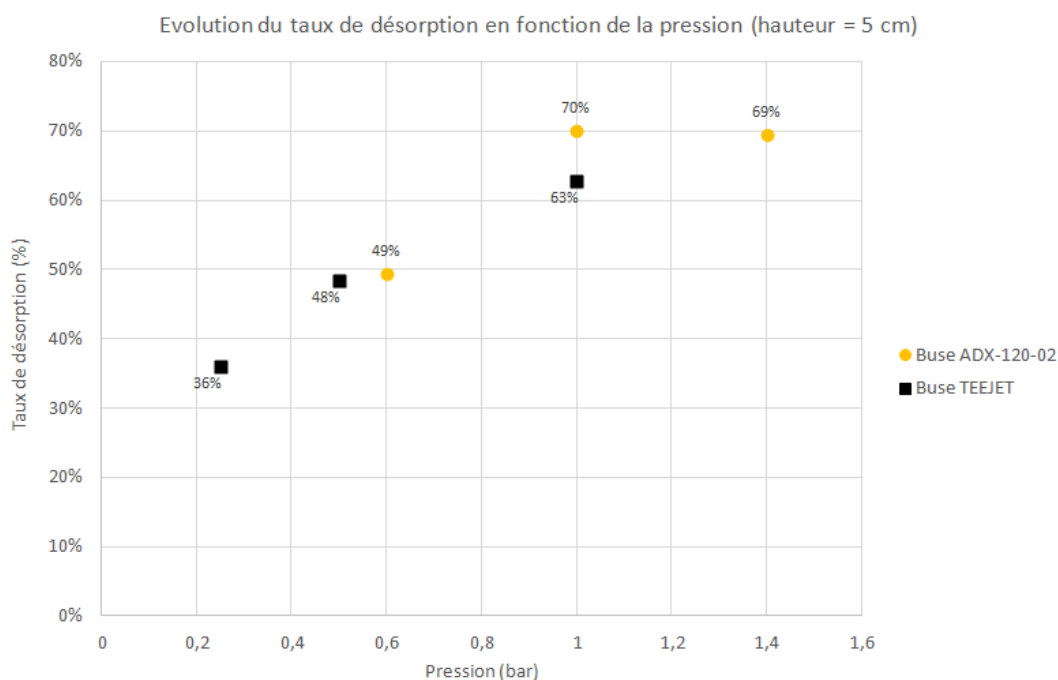


Figure 61 : Taux de désorption de l’ozone en fonction de la pression et de la buse (buses ADX-120-02 et TEEJET).
(EI PURPAN – LISBP INSA).

Ainsi, d’après cette étude, pour limiter le taux de désorption dans le cas des technologies étudiées, les gouttelettes doivent avoir une taille supérieure à 1 mm, être produites à basse pression (inférieure à 0,2 bar) et à faibles débits (inférieurs à 30 L/h). Enfin, il est nécessaire de minimiser la distance buse/surface-cible. Une recherche de technologie ne nécessitant pas de mise sous pression serait un axe de travail.

C- Perspectives

Ce travail de thèse a demandé la maîtrise du pathosystème végétal *Malus-V.inaequalis*. Ce pathosystème pourra être mis à profit pour réaliser des expérimentations complémentaires à celles présentées dans ce manuscrit (application de nouveaux mouillants, variation des doses appliquées ou de la fréquence de traitement, ...) afin d'améliorer les performances de l'eau chargée en ozone en vue du transfert en verger. Ce pathosystème pourra également être employé pour tester l'action anti-fongique de nouvelles molécules ou produits phytosanitaires.

Au vu des conclusions faites suite aux expérimentations sur jeunes plants et à l'étude du phénomène de désorption, la quantité d'eau apportée en verger lors de la dernière campagne était trop importante et la concentration en ozone trop faible. De nouveaux essais seront réalisés durant la campagne 2016 après amélioration du système d'application. L'eau chargée en ozone pourra être le seul traitement ou pourra être intégré au programme de traitements classique. Dans ce dernier cas, son application pourrait être préférée aux produits phytosanitaires usuellement employés lorsque la pression fongique serait modérée. En cas de risques importants, les produits phytosanitaires seraient employés à la place de l'eau chargée en ozone. Ce type de stratégies permettrait de limiter l'emploi de pesticides et d'abaisser l'Indice de Fréquence de Traitement, comme cela est préconisé par le Plan Ecophyto 2018.

D'autre part, il sera intéressant de poursuivre les tests réalisés sur pommes lors de leur sortie du verger et avant leur stockage. Ces expériences, débutées en fin de thèse et dont les résultats n'étaient pas disponibles lors de la rédaction du présent manuscrit, consistent en un trempage des pommes contaminées dans des bains d'eau chargée en ozone. Les paramètres testés sont la concentration en ozone dissous dans l'eau ainsi que la durée de trempage. En vue d'accroître l'efficacité du traitement, d'autres modes d'application sont envisageables et seront expérimentés (application de l'ozone sous sa forme gazeuse ou d'eau ozonée par pulvérisation sur la surface des pommes).

Enfin, il a été principalement observé, durant cette thèse, les conséquences de l'eau chargée en ozone sur les spores et le développement de la maladie. Cependant, Graham et al. (2011) ont mis en évidence qu'appliquer de l'eau chargée en ozone par goutte-à-goutte

sur des pieds de tomate permettait d'accroître la surface des feuilles, le poids de matière sèche et l'épaisseur de la tige. De même, l'irrigation par pulvérisation permet d'augmenter le nombre de fleurs produits par *W.florida* (Graham et al., 2009). L'ozone aurait donc un effet stimulateur de croissance (Sloan & Engelke, 2005). Il serait également intéressant de mesurer l'activité photosynthétique des feuilles afin d'évaluer les conséquences de l'application de l'ozone sur les échanges gazeux. Par ailleurs, Ren et al. (2015) ont montré que l'application d'ozone gazeux sur tomate entraîne la production d'acide jasmonique et d'acide salicylique, molécules impliquées dans les principaux mécanismes de défenses de la plante. Ainsi, l'évaluation de la réponse du végétal par le suivi de critères de développement et la compréhension du rôle de stimulation de l'ozone présentent un réel intérêt et pourraient faire l'objet de nouvelles expérimentations.

Enfin, une étude de la réglementation en vigueur en France et en Europe reste à réaliser afin de mettre en évidence les éléments-clés à aborder pour une éventuelle homologation en verger ou sur pommes fraîchement récoltées. L'évaluation de la toxicité de l'ozone sur les micro-organismes participant à l'écosystème du verger et plus globalement sur l'environnement sera nécessaire. Il sera également primordial d'estimer les conséquences de l'application de l'ozone sur les propriétés organoleptiques et physiques de la pomme.

Conclusion générale

Conclusion générale

La filière pomme française doit faire face à des attentes sociétales croissantes : la pomme doit être belle, savoureuse, produite dans le respect de l'environnement et ne présenter aucun risque sanitaire. Ce fruit est pour autant la cible de nombreuses attaques de parasites, contrôlées principalement par l'emploi de produits phytosanitaires.

C'est le cas des espèces fongiformes, responsables de nombreuses maladies, qui sont sources de traitements fongicides fréquents, aujourd'hui fortement critiqués de part leurs nuisances environnementales et sanitaires. L'ozone a des propriétés anti-fongiques connues et se caractérise par une faible rémanence. L'eau chargée en ozone, pulvérisée sur les pommiers, pourrait donc être une solution alternative aux produits phytosanitaires.

Dans ce contexte, l'objet d'étude de cette thèse a été d'évaluer les performances anti-fongiques de l'eau chargée en ozone contre *V.inaequalis*, *B.cinerea*, *N.alba* et *P.syringae*, responsables des principales maladies fongiques du pommier.

Dans l'optique de disposer des principales réponses nécessaires pour envisager le transfert du traitement antifongique à base d'eau chargée en ozone au verger, le travail de thèse s'est structuré en étapes successives, partant du laboratoire et allant jusqu'à l'application sur jeunes plants contaminés. Les conditions d'application ont été graduellement complexifiées en s'intéressant à différents stades de développement fongiques, mais également en modifiant les matrices de germination et le contexte de traitement. A chacune de ces étapes, des verrous technologiques ont été levés. Cette étude a permis de vérifier l'effet anti-fongique de l'application de l'ozone sur les principales espèces fongiques responsables des maladies du pommier, de mieux appréhender les mécanismes d'action en jeu au niveau membranaire et de mettre en évidence les points de vigilance afin d'avoir les outils de raisonnement pour la mise en œuvre d'un tel traitement en conditions réelles.

Au terme de cette étude, ces résultats prometteurs ont donné les axes de travail permettant d'envisager un transfert au verger. Ce transfert pourra s'appuyer sur les informations obtenues et nécessitera de s'intéresser à la dose d'ozone appliquée ainsi qu'à la fréquence et au moment d'application de l'eau chargée en ozone. Des tests supplémentaires pourront également être effectués sur supports simplifiés mis au point durant cette thèse (tels que les feuilles de cellophane ou les jeunes plants contaminés) afin

Conclusion générale

d'optimiser les performances du traitement. Enfin, des essais en verger seront à mener afin de confirmer la faisabilité de la technique.

Au-delà des traitements sur pommiers, cette étude pourra constituer une base de travail pour envisager l'application d'eau chargée en ozone contre des micro-organismes pathogènes présents sur d'autres cultures.

Bibliographie

- Abro, M. A., Syed, R. N., Yasmin, A., Abro, S., Kumar, A., & Nicot, P. C. (2014). Different nitrogen fertilization regimes influences the susceptibility of lettuce plants to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Science International*, 26(1), 325–329.
- Achen, M., & Yousef, A. E. (2001). Efficacy of Ozone Against *Escherichia coli* O157:H7 on Apples. *Food Microbiology and Safety*, 66(9), 1380–1384.
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Elsevier Academic Press, Oxford, UK, p.922.
- Ajouz, S. (2009). *Estimation du potentiel de résistance de Botrytis cinerea à des biofongicides*. Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, FRA, 2009AVIG0622.
- Alexopoulos, A., Plessas, S., Ceciu, S., Lazar, V., Mantzourani, I., Voidarou, C., ... Bezirtzoglou, E. (2013). Evaluation of ozone efficacy on the reduction of microbial population of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa*) and green bell pepper (*Capsicum annuum*). *Food Control*, 30(2), 491–496.
- Ames, Z. R., Feliziani, E., & Smilanick, J. L. (2013). Germination of fungal conidia after exposure to low concentration ozone atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, 83, 22–26.
- Anses. (2010). Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France. Synthèse et recommandations du Comité d'orientation et de prospective scientifique de l'observatoire des résidus de pesticides (ORP)., *Rapport sc*, 365.
- Antony-Babu, S., & Singleton, I. (2009). Effect of ozone on spore germination, spore production and biomass production in two *Aspergillus* species. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 96(4), 413–422.
- Baig, S., & Mouchet, P. (2010). Oxydation et réduction appliquées au traitement de l'eau - Ozone - Autres et appareillage oxydants - Oxydation avancée - Réducteurs. *Techniques de L'ingénieur*, W2 702(6), 1–39.
- Bigouin, C., Chambonniere, S., Domenget, C., Ghion, K., Dordolo, M., Larrieu, J.-F., & Sagnes, J.-L. (2013). Chiffres repères en arboriculture fruitière. *CER France et Chambre d'Agriculture Du Tarn-Et-Garonne*, 1–14.
- Bondoux, P. (1992). *Maladies de conservation des fruits à pépins pommes et poires* (INRA Editi). Paris.
- Bourgin, M. (2011). *Etude de la décomposition de produits phytosanitaires par l'ozone : Application au traitement des semences déclassées*. Thèse de Doctorat en Sciences des Agroressources, Institut National Polytechnique de Toulouse, FRA, 2011INPT0005.

- Bowen, J. K., Mesarich, C. H., Bus, V. G. M., Beresford, R. M., Plummer, K. M., & Templeton, M. D. (2011). *Venturia inaequalis*: The causal agent of apple scab. *Molecular Plant Pathology*, 12(2), 105–122.
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <http://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Brook, P. J. (1976). Seasonal pattern of maturation of *Venturia inaequalis* ascospores in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 19(1), 103–109.
- Brun, L., Didelot, F., & Parisi, L. (2007). Stratégies de protection innovantes contre la tavelure du pommier : conception , évaluation et intégration en vergers Importance de la tavelure (due à *Venturia inaequalis*) Importance de la tavelure • La grande majorité des variétés de pommier cultivées , (1), 1–18.
- Carisse, O., & Dewdney, M. (2002). A review of non-fungicidal approaches for the control of apple scab. *Phytoprotection*, 83(1), 1–29.
- Carisse, O., & Jobin, T. (2006). La tavelure du pommier : mieux comprendre pour mieux intervenir. *Agriculture et Agroalimentaire Canada*, 10203F, 26p.
- Carnard, J.-P., & Magdelaine, C. (2010). Produits phytosanitaires : risques pour l'environnement et la santé. Connaissances des usages en Zone non agricole. *Institut D'Aménagement et de l'Urbanisme Ile de France*, 61 p.
- Chapman, K. S., Sundin, G. W., & Beckerman, J. L. (2011). Identification of Resistance to Multiple Fungicides in Field Populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease*, (August), 921–926.
- Cho, M., Kim, J., Kim, J. Y., Yoon, J., & Kim, J.-H. (2010). Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research*, 44(11), 3410–8.
- Da Silva, L. M., Santana, M. H. P., & Boodts, J. F. C. (2003). Electrochemistry and green chemical processes: Electrochemical ozone production. *Quimica Nova*, 26(6), 880–888.
- Dik, A. J., & Elad, Y. (1999). Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 105(2), 123–137.
- Dik, A. J., & Wubben, J. P. (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* / Ed. par Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski et N. Delen (Kluwer Aca, pp. 319–333).
- El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., & Benhamou, N. (1997). Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 12(2), 183–194.

Bibliographie

- Elad, Y., & Stewart, A. (2004). Microbial Control of Botrytis spp. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* / Ed. par Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski et N. Delen (Kluwer Aca, pp. 223–241).
- Faretra, F., Antonacci, E., & Pollastro, S. (1988). Sexual behaviour and mating system of Botryotinia fuckeliana, teleomorph of Botrytis cinerea. *Journal of General Microbiology*, (134), 2543–2550.
- Fernandez, B., & Quellard, N. (1998). La Microscopie Électronique à Balayage. Unité de pathologie ultrastructurale et expérimentales du CHU de Poitiers (p. 74).
- Freitas-Silva, O., Morales-Valle, H., & Venâncio, A. (2013). Potential of Aqueous Ozone to Control Aflatoxigenic Fungi in Brazil Nuts. *ISRN Biotechnology*, 7. Retrieved from
- Fujiwara, K., & Fujii, T. (2004). Research Note: Effects of Ozonated Water Spray Droplet Size and Distance on the Dissolved Ozone Concentration at the Spray Target. *Ozone: Science & Engineering*, 26(5), 511–516.
- Fujiwara, K., Hayashi, Y., & Park, J.-S. (2011). Spraying Ozonated Water under Well-Ventilated Conditions Does Not Cause Any Visible Injury to Fruit-Vegetable Seedlings. *Ozone: Science & Engineering*, 33(2), 179–182.
- Gariépy, T. D., Rahe, J. E., Lévesque, C. A., Spotts, R. A., Sugar, D. L., & Henriquez, J. L. (2005). Neofabraea species associated with bull's-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27, 118–124.
- Giraud, M., & Coureau, C. (2014). Le point sur.... *Le Point Sur Les Gleosporioses*, Editions CTIFL, Volume 5, 9p.
- Gomez, C., Brun, L., Chauffour, D., De le Vallee, D., & Dumont, E. (2004). Effet de la réduction de l'inoculum d'automne sur le développement des épidémies de tavelure en verger de pommiers biologiques. *Presented at Journées Techniques Fruits et Légumes Biologiques, Saint Pierre Des Corps, FRA (2004-11-30)*.
- Graham, T., Zhang, P., & Dixon, M. (2011). Aqueous ozone in the root zone: Friend or foe? *Journal of Horticulture and Forestry*, 3(2), 58–62. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/journal/JHF/article-abstract/54ABF1C2098>
- Graham, T., Zhang, P., Zheng, Y., & Dixon, M. (2009). Phytotoxicity of Aqueous Ozone on Five Container-grown Nursery Species. *Horticultural Science*, 44(3), 774–780.
- Greene, A. K., Few, B. K., & Serafini, J. C. (1993). A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. *Journal of Dairy Science*, 76(11), 3617–3620.
- Greene, A. K., Guzel-Seydim, Z. B., & Seydim, A. . (2012). Chemical and Physical Properties of Ozone. In *Ozone in food processing* / Ed. par C. O'Donnel, B.K.Tiwari, P.J. Cullen et R.G. Rice. Oxford: Wiley-Blackwell Editions (While-Blac, pp. 19–29).

- Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K., & Seydim, a. C. (2004). Use of ozone in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, 37(4), 453–460.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.10.014>
- Harris, D. C. (1979). The occurrence of *Phytophthora syringae* in fallen apple leaves. *Annals of Applied Biology Journal*, 91, 309–312.
- Höhn, H., Bünter, M., Dubuis, P., Gölles, M., Holliger, E., Kehrli, P., ... Wirth, J. (2013). Guide phytosanitaire pour l'arboriculture fruitière 2010 / 2011. *Département Fédéral de l'Economie DFE, Station de Recherche, Agroscope Changins-Wädenswil ACW*, 57 p.
- Hoigne, J. (1991). Mécanismes et cinétiques des réactions de l'ozone et des composés dissous. *Ozone et Ozonation Des Eaux Par W.J. Masschelein. Editions Lavoisier, Techniques et Documentations.*, 68–72.
- Hoigne, J., & Bader, H. (1983). Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water - I. *Water*, 17, 173–183.
- Holb, I. J. (2006). Effect of six sanitation treatments on leaf litter density, ascospore production of *Venturia inaequalis* and scab incidence in integrated and organic apple orchards. *European Journal of Plant Pathology*, 115(3), 293–307.
- Ikehata, K., Jodeiri Naghashkar, N., & Gamal El-Din, M. (2006). Degradation of Aqueous Pharmaceuticals by Ozonation and Advanced Oxidation Processes: A Review. *Ozone: Science & Engineering*, 28(6), 353–414. <http://doi.org/10.1080/01919510600985937>
- Ineris. (2012). Azoxystrobine n° CAS : 131860-33-8. *Institut National de l'Environnement Industriel et Des Risques : Valeur Guide Environnementale. DRC-12-118981-00270A*, pp.1–20.
- Ineris. (2013). Mancozèbe n° CAS : 8018-01-7. *Institut National de l'Environnement Industriel et Des Risques : Valeur Guide Environnementale. DRC-14-136849-03075A*, pp.1–24.
- Iriti, M., & Faoro, F. (2008). Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water, Air, and Soil Pollution*, 187(1-4), 285–301.
- Jamar, L. (2011). *Innovative strategies for the control of apple scab (Venturia inaequalis [Cke.] Wint.) in organic apple production*. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques et ingénierie biologique, Académie Universitaire Wallonie-Europe, Université de Liège - Gembloux Agro-Bio Tech, FUSAGxetd-09052011-115018, 196 p.
- Khadre, M. A., Yousef, A. E., & Kim, J. G. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *Journal of Food Science*, 66(9), 1242–1252.
- Kobayashi, F., Ikeura, H., Ohsato, S., Goto, T., & Tamaki, M. (2011). Disinfection using ozone microbubbles to inactivate *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Crop Protection*, 30(11), 1514–1518.

Bibliographie

- Komanapalli, I. R., & Lau, B. H. (1996). Ozone-induced damage of *Escherichia coli* K-12. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5-6), 610–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9008892>
- Kucheryava, N., Bowen, J. K., Sutherland, P. W., Conolly, J. J., Mesarich, C. H., Rikkerink, E. H. A., ... Templeton, M. D. (2008). Two novel *Venturia inaequalis* genes induced upon morphogenetic differentiation during infection and in vitro growth on cellophane. *Fungal Genetics and Biology*, 45(10), 1329–1339.
- Lachapelle, J. (2004). Microscopie, méthodes d'examen, colorations. *Revue Du Cercle de Mycologie de Bruxelles*, 4, 35–71.
- Lefevre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J.-P., Therond, P., & Torreilles, J. (1998). Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de Biologie Clinique*, 56, 305–319.
- Leroux, P. (2004). Chemical Control of Botrytis and its Resistance to Chemecal Fungicides. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control / Ed. par Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski et N. Delen* (pp. 195–222).
- Leroux, P., & Gredt, M. (1995). Étude in vitro de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides anilinopyrimidines. *Agronomie*, 15(6), 367–370.
- MacHardy, W. E., Gadoury, D. M., & Gessler, C. (2001). Parasitic and Biological Fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to Disease Management Strategies. *Plant Disease*, 85(10), 1036–1051.
- Makky, E. A., Park, G.-S., Choi, I.-W., Cho, S.-I., & Kim, H. (2011). Comparison of Fe(VI) (FeO₄(2-)) and ozone in inactivating *Bacillus subtilis* spores. *Chemosphere*, 83(9), 1228–33.
- Masschelein, W. J. (1998). Ozone Generation: Use of Air, Oxygen or Air Simpsonized with Oxygen. *Ozone: Science & Engineering*, 20(3), 191–203.
- Maxin, P., Weber, R. W. S., Pedersen, H. L., & Williams, M. (2012). Control of a wide range of storage rots in naturally infected apples by hot-water dipping and rinsing. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 25–31.
- Miller, F., Silva, C. M., & Brandão, T. S. (2013). A Review on Ozone-Based Treatments for Fruit and Vegetables Preservation. *Food Engineering Reviews*, 5(2), 77–106.
- Minas, I. S., Karaoglanidis, G. S., Manganaris, G. A., & Vasilakakis, M. (2010). Effect of ozone application during cold storage of kiwifruit on the development of stem-end rot caused by *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 58(3), 203–210.
- Ministère de l'agriculture. (2015). E-Phy, le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en

- France. *Base Nationale E-Phy Des Produits Pharmaceutiques*, [Http://e-Phy.agriculture.gouv.fr/](http://e-Phy.agriculture.gouv.fr/).
- Moore, G., Griffith, C., & Peters, A. (2000). Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. *Journal of Food Protection*, 63(8), 1100–1106.
- Mylona, K., Kogkaki, E., Sulyok, M., & Magan, N. (2014). Efficacy of gaseous ozone treatment on spore germination, growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in vitro and in situ in maize. *Journal of Stored Products Research*, 59, 178–184.
- O'Donnel, C., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., & Rice, R. . (2012). Status and trends of Ozone in Food Processing. In *Ozone in food processing/ Ed. par C. O'Donnel, B.K.Tiwari, P.J. Cullen et R.G. Rice. Oxford: Wiley-Blackwell Editions* (p. 312).
- Oliva, A., Spira, A., & Multigner, L. (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 16(8), 1768–1776.
- Ong, K. C., Cash, J. N., Zabik, M. J., Siddiq, M., & Jones, A. L. (1996). Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. *Food Chemistry*, 55(2), 153–160.
- Ong, M. K., & Ali, A. (2015). Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 113–119.
- Ozkan, R., Smilanick, J. L., & Karabulut, O. A. (2011). Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), 47–51.
- Palou, L., Smilanick, J. L., Crisosto, C. H., & Mansour, M. (2001). Effect of Gaseous Ozone Exposure on the Development of Green and Blue Molds on Cold Stored Citrus Fruit. *Plant Disease*, 85(6), 632–638.
- Park, J.-S., Ishii, M., Okushima, L., Sase, S., & Fujiwara, K. (2008). Effects of Ozonated Water-fog Cooling on Ozone Gas Concentrations and Population Densities of Airborne Bacteria and Fungi on Plant Leaves in a Naturally Ventilated Greenhouse. *JARQ*, 42(4), 291–297.
- Parke, J., & Eberhart, J. (2015). Phytophthora basics. What is Phytophthora ? *Forest Phytophthora of the World*. [Http://forestphytophthoras.org/phytophthora-Basics](http://forestphytophthoras.org/phytophthora-Basics).
- Pascual, A., Llorca, I., & Canut, A. (2007). Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disfection activities. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 29–35.
- Petrelli, G., & Mantovani, A. (2002). Environmental risk factors and male fertility and reproduction. *Contraception*, 65, 297–300.

Bibliographie

- Pierron, R. J. G., Pages, M., Couderc, C., Compant, S., Jacques, A., & Violleau, F. (2015). In vitro and in planta fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*. *Scientia Horticulturae*, 189, 184–191.
- Poullette, B. (2015). Pratiques phytosanitaires en arboriculture Des traitements phytosanitaires dans les vergers. *Agreste Primeur*, (323), 1–8.
- Pryor, W. A. (1992). How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts? *Free Radical Biology and Medicine*, 12(1), 83–88.
- Ramade, F. (2011). Introduction à l'écochimie. Les substances chimiques de l'écosphère à l'Homme (Tec and Do, p. 828).
- Ran, Z., Li, S., Huang, J., Yuan, Y., Cui, C., & Williams, C. D. (2010). Inactivation of *Cryptosporidium* by ozone and cell ultrastructures. *Journal of Environmental Sciences*, 22(12), 1954–1959.
- Raudales, R. E., Parke, J. L., Guy, C. L., & Fisher, P. R. (2014). Control of waterborne microbes in irrigation: A review. *Agricultural Water Management*, 143, 9–28.
- Ren, Q., Sun, Y., Guo, H., Wang, C., Li, C., & Ge, F. (2015). Elevated ozone induces jasmonic acid defense of tomato plants and reduces midgut proteinase activity in *Helicoverpa armigera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 154(3), 188–198.
- Restaino, L., Frampton, E. W., Hemphill, J. B., & Palnikar, P. (1995). Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), 3471–5.
- Rice, R. G. (2012). Health and Safety Aspects of Ozone Processing. In *Ozone in food processing/ Ed. par C. O'Donnell, B.K.Tiwari, P.J. Cullen et R.G. Rice. Oxford: Wiley-Blackwell Editions* (pp. 265–288).
- Rice, R. G., Graham, D. ., & Lowe, M. T. (2002). Recent Ozone Applications in Food Processing and Sanitation. *Food Safety Magazine*, 0–3.
- Roth, J. A., & Sullivan, D. E. (1981). Solubility of Ozone in Water. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, 137–140.
- Roth, J., & Sullivan, D. (1981). Solubility of ozone in water. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, 20, 137–140.
- Roustan, M. (2003). Coefficient de transfert et modèle de transfert. In *Transferts gaz-liquide dans les procédés de traitement des eaux et des effluents gazeux. Coordinateur : M.Roustan. Editions Lavoisier, Techniques et documentations* (pp. 131–168).
- Sands, D. A., Clawson, A. D., Lavelle, D., & Schmitz, H. (2004). Ozone systems and methods for agricultural applications. *U.S Pat. 2004, US 6,817,541 B2*, 13.

Bibliographie

- Schmitt, A., Kunz, S., Nandi, S., Seddon, B., & Ernst, A. (2002). Use of *Reynoutria sachalinensis* plant extracts, clay preparations and *Brevibacillus brevis* against fungal diseases of grape berries. In *ECO-FRU-VIT. 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture from 4th to 7th February 2002 at Weinsberg, Germany*.
- Scott, D. B. M., & Leshner, E. C. (1962). Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 85(October), 567–576.
- Sharpe, D., Fan, L., McRae, K., Walker, B., MacKay, R., & Doucette, C. (2009). Effects of ozone treatment on *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* in relation to horticultural product quality. *Journal of Food Science*, 74(6), M250–7.
- Sloan, J. J., & Engelke, M. C. (2005). Effect of ozonated water on creeping bentgrass growth in a sand medium. *HortTechnology*, 15(March), 148–152.
- Smereka, K. J., MacHardy, W. E., & Kausch, A. P. (1987). Cellular differentiation in *Venturia inaequalis* ascospores during germination and penetration of apple leaves. *Revue Canadienne de Botanique*, 65(12), 2549–2561.
- Smilanick, J. L., Margosan, D. M., & Mlikota Gabler, F. (2002). Impact of Ozonated Water on the Quality and Shelf-life of Fresh Citrus Fruit, Stone Fruit, and Table Grapes. *Ozone: Science & Engineering*, 24(5), 343–356.
- Snowdon, A. L. (2010). A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. *Université of Cambridge, Masson Publishing, Vol.1*, 320.
- Spotts, R. A., Cervantes, L. A., & Niederholzer, F. J. A. (1997). Effect of dolomitic lime on production of asci and pseudothecia of *Venturia inaequalis* and *V-pirina*. *Plant Disease*, 81(1), 96–98.
- Steffen, H., & Rice, R. G. (2008a). The PhytO3 Tech Crop Protection Technology – Trial Results in a 2, 700 ha (6,500 acre) Soy Farm in Brazil. *Ozone: Science & Engineering*, 30(3), 210–215.
- Steffen, H., & Rice, R. G. (2008b). The PhytO3 tech crop protection technology for microorganism and insect control using ozone, UV, and dipole-electrical air jet spray technologies - Technical basis and possible chemistries involved. *Ozone Science and Engineering*, 30(3), 216–227.
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, (Appendix 3B).
- Tapp, C., & Rice, R. . (2012). Generation and Control of Ozone. In *Ozone in food processing/ Ed. par C. O'Donnell, B.K.Tiwari, P.J. Cullen et R.G. Rice. Oxford: Wiley-Blackwell Editions* (p. 312).

Bibliographie

- Tiwari, B. K., & Muthukumarappan, K. (2012). Ozone in Fruit and Vegetables Processing. In *Ozone in food processing/ Ed. par C. O'Donnel, B.K.Tiwari, P.J. Cullen et R.G. Rice. Oxford: Wiley-Blackwell Editions* (pp. 55–80).
- Torres, B., Tiwari, B. K., Patras, A., Wijngaard, H. H., Brunton, N., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2011). Effect of ozone processing on the colour, rheological properties and phenolic content of apple juice. *Food Chemistry*, 124(3), 721–726.
- Vincent, C., Rancourt, B., & Carisse, O. (2004). Apple leaf shredding as a non-chemical tool to manage apple scab and spotted tentiform leafminer. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 104(3), 595–604.
- Wu, D., You, H., Zhang, R., Chen, C., & Lee, D. J. (2011). Inactivation of *Amphidinium* sp. in ballast waters using UV/Ag-TiO₂+O₃ advanced oxidation treatment. *Bioresource Technology*, 102(21), 9838–9842.
- Xu, X. M., & Robinson, J. (2005). Modelling the effects of wetness duration and fruit maturity on infection of apple fruits of Cox's Orange Pippin and two clones of Gala by *Venturia inaequalis*. *Plant Pathology*, 54(3), 347–356.
- Zotti, M., Porro, R., Vizzini, A., & Mariotti, M. G. (2008). spp. by Ozone Treatment. *Ozone: Science & Engineering*, 30(6), 423–430.

Liste des illustrations

I- Liste des tableaux

Tableau 1 : Périodes d'application et modes d'action des principales substances actives utilisées en France contre la tavelure	34
Tableau 2 : Effets aigus et chroniques des produits phytosanitaires sur l'Homme (Carnard & Magdelaine, 2010; Oliva et al., 2001; Petrelli & Mantovani, 2002).	44
Tableau 3 : Potentiels d'oxydation relatifs au potentiel de l'électrode standard à hydrogène (Hunsberger J.F., 1977)	50
Tableau 4 : Principales constantes physiques de l'ozone déterminées par Manley et Niegowski en 1967 (Guzel-Seydim et al., 2004).	51
Tableau 5 : Relation entre la température et la solubilité de l'ozone dans l'eau proposée par Rice, R. G., Robson, C. M., Miller, G. W., et Hill, A. G en 1981 (Guzel-Seydim et al., 2004).	53
Tableau 6 : Temps de demi-vie selon la température et la forme de l'ozone (Miller, Silva, & Brandão, 2013)	55
Tableau 7 : Inventaire des publications utilisant de l'ozone gazeux sur espèces fongiques in vitro	58
Tableau 8 : Publications utilisant de l'ozone dissous dans l'eau pour des tests in vitro sur espèces fongiques.	61
Tableau 9 : Inventaire des structures cellulaires supposées touchées par l'ozone en fonction des publications. Les numéros présents dans les cases indiquent l'ordre dans lequel ces différents éléments seraient atteints.	63
Tableau 10 : Inventaire des publications appliquant de l'ozone sur pommes réalisé par Miller et al. (2013)	70
Tableau 11 : Modalités appliquées par bullage sur suspensions de spores	82
Tableau 12 : Modalités appliquées par addition d'eau préalablement chargée en ozone sur les suspensions de spores de <i>P.syringae</i> .	83
Tableau 14 : Critères de décision pour la mesure du taux de germination de <i>V.inaequalis</i> , <i>B.cinerea</i> et <i>N.alba</i> après dépôt sur cellule de <i>Malassez</i> .	84
Tableau 13 : Conditions de culture de <i>V.inaequalis</i> , <i>B.cinerea</i> et <i>N.alba</i> après dépôt sur cellule de <i>Malassez</i> .	84
Tableau 15 : Minutage du protocole d'évaluation de l'effet de l'eau chargée en ozone sur spores en cours de développement (Cas des échantillons recevant le premier traitement 8 heures après inoculation)	91
Tableau 16 : Caractéristiques des quatre modalités du protocole A (protocole in vivo de base).	94
Tableau 17 : (A) Echelle simplifiée du niveau de surface foliaire atteint par la tavelure (source : INRA Angers) et (B) jeune plant atteint par la tavelure	96
Tableau 18 : Equations à variables codées modélisant le taux de germination (Y) des trois espèces fongiques où X_1 représente la concentration en ozone, où X_2 correspond à la durée d'application du traitement et où X_1X_2 correspond à l'interaction de ces deux paramètres.	109
Tableau 19 : Codification des différentes modalités (quand le nombre de traitement est égal à 1).	132
Tableau 20 : Caractéristiques des quatre modalités du protocole A (protocole in vivo de base).	139
Tableau 21 : Caractéristiques des quatre modalités du protocole B (protocole « Séchage »).	142
Tableau 22 : Humidité théorique sur feuille en fonction des protocoles et des modalités.	145
Tableau 23 : Caractéristiques des quatre modalités du protocole C (protocole « 2 traitements »).	148

II- Liste des figures

Figure 1 : Cycle biologique de <i>V.inaequalis</i> (Bowen et al., 2011)	30
Figure 2 : Symptômes de la tavelure sur (A) feuilles (photographie BONDOUX P.) et (B) fruits (photographie BONDOUX P.).	31
Figure 3 : Pratiques culturales mises en œuvre en verger pour neutraliser le développement de la tavelure (schéma amélioré par Jamar (2009) issu de la publication de MacHardy et al., (2001)).	32
Figure 4 : Mode d'action des fongicides de contact (Carisse & Jobin, 2006)	34
Figure 5 : Mode d'action des fongicides pénétrants (Carisse & Jobin, 2006)	35
Figure 6 : Table de Mills et Laplace (1951), prédiction du niveau d'infection de la tavelure en fonction de la durée d'humectation et de la température.	36
Figure 7 : Nombre moyen de fongicides employés en verger selon le bassin de production et le pathogène ciblé (Poullette, 2015)	37
Figure 8 : (A) Cycle biologique de <i>Botrytis cinerea</i> (Agrios, 2005) et (B) maladie sur pommes	38
Figure 9 : (A) Cycle biologique supposé de <i>Neofabraea alba</i> (Giraud & Coureau, 2014) et (B) symptômes sur fruit	40
Figure 10 : (A) Cycle biologique du genre <i>Phytophthora</i> (Parke & Eberhart, 2015) et (B) symptômes sur fruits (Giraud, 2010)	41
Figure 11 : (A) Photographie d'un diffuseur (Dome diffusers KTL TM , Ozonia) et (B) schéma d'un tube à fritté	48
Figure 12 : Schéma d'un injecteur Venturi	49
Figure 13 : Solutions techniques permettant le transfert gaz-liquide : (A) Mélangeur statique (B) Tube en U (C) Réacteur à turbine (D) Colonne à garnissage (Baig & Mouchet, 2010).	49
Figure 14 : Structures de résonance de la molécule d'ozone proposées	50
Figure 15 : Cycloaddition de l'ozone sur une liaison éthylénique (Baig & Mouchet, 2010)	52
Figure 16 : Représentation du modèle du double film proposé par Lewis et Whitman en 1924 (représentation issue du livre Roustan (2003)).	54
Figure 17 : Déstructuration de la membrane plasmique suite à la peroxydation des phospholipides membranaires par l'ozone (Iriti & Faoro, 2008)	64
Figure 18 : Photographies de <i>Salmonella enteridis</i> (A) avant ozonation et (B) après ozonation mettant en évidence l'altération de la membrane (Dave, 1999)	65
Figure 19 : Démarche générale des travaux de thèse	72
Figure 20 : Pomme atteinte par <i>N.alba</i> , portant du mycélium blanc ainsi que les pycnides du champignon.	78
Figure 21 : Procédé d'ozonation comportant une colonne de bullage de 20 mL	81
Figure 22 : Peroxydation des phospholipides membranaires, voie de synthèse du malondialdéhyde à partir d'acides gras polyinsaturés (Lefevre et al., 1998)	86
Figure 23 : Exemple de courbe de calibration obtenue à partir des standards de MDA	87
Figure 24 : Protocole d'évaluation de l'effet d'un ou deux traitements à l'eau ozonée sur spores en cours de germination	90
Figure 25 : Présentation des différentes phases de l'expérimentation sur modèle in vivo	92
Figure 26 : Jeunes plants au stade 3-4 feuilles	93
Figure 27 : Schéma du procédé de préparation de l'eau chargée en ozone comportant une colonne de bullage de 200 mL	95
Figure 28 : Influence des différentes modalités de bullage d'ozone sur les taux de germination de (A) <i>B.cinerea</i> , (B) <i>V.inaequalis</i> et (C) <i>N.alba</i> . Les modalités non-différentes sont regroupées par une même lettre (Tests Newman-Keuls, $\alpha = 0,05$)	102
Figure 29 : Evaluation de l'effet du bullage de l'ozone sur les spores de <i>V.inaequalis</i> par cellules de Malassez et sur milieu gélosé.	104
Figure 30 : Réponse du taux de germination de <i>B.cinerea</i> en fonction de la concentration en ozone et de la durée d'application.	106

Liste des illustrations

Figure 31 : Réponse du taux de germination de <i>V.inaequalis</i> en fonction de la concentration en ozone et de la durée d'application.	107
Figure 32 : Réponse du taux de germination de <i>N.alba</i> en fonction de la concentration en ozone et de la durée d'application.	108
Figure 33 : Développement mycélien sur boîtes de Pétri après inoculation des spores de <i>V.inaequalis</i> traitées ou non-traitées après 11 jours (série A) et après 30 jours (série B) en chambre de culture. (DO = Dose d'ozone appliquée en mg.mL^{-1})	111
Figure 34 : Développement mycélien sur boîtes de Pétri après inoculation des spores de <i>B.cinerea</i> traitées ou non-traitées après 5 jours (série A) et après 30 jours (série B) en chambre de culture. (DO = Dose d'ozone appliquée en mg.mL^{-1})	112
Figure 35 : Evaluation de l'effet de l'eau chargée en ozone sur les spores de <i>P.syringae</i> . Les modalités (3 répétitions de 3 essais) sont regroupées en groupes statistiquement différents obtenus par Analyse de Variance. Chaque groupe porte une lettre.	113
Figure 36 : Schéma représentant les courbes théoriques de la concentration en ozone dissous dans l'eau en fonction du temps et selon le mode d'application.	114
Figure 37 : Développement mycélien sur boîtes de Pétri après inoculation des spores de <i>P.syringae</i> traitées (modalités $c = 1,6.10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ et $g = 7,1.10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$) ou non-traitées ($0,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) après 7 jours (série A) et après 30 jours (série B) en chambre de culture.	115
Figure 38 : Concentrations en MDA (en nmol.mL^{-1}) en fonction de la dose d'ozone appliquée sur les spores de (A) <i>B.cinerea</i> , (B) <i>V.inaequalis</i> et (C) <i>N.alba</i> .	118
Figure 39 : Taux de germination (en %) des spores de (A) <i>B.cinerea</i> , (B) <i>V.inaequalis</i> et (C) <i>N.alba</i> en fonction de la concentration en MDA produit (en nmol/mL d'échantillons).	120
Figure 40 : Observation au Microscope Optique de spores de <i>V.inaequalis</i> non-traitées (DO = 0 mg.mL^{-1}) et traitées (DO = $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) à deux grossissements (100 et 400).	122
Figure 41 : Observation au Microscope Optique de spores de <i>V.inaequalis</i> non-traitées (DO = 0 mg.mL^{-1}) et traitées (DO = $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) après coloration au bleu de Trypan à deux grossissements (100 et 400).	123
Figure 42 : Observation au Microscope Optique de spores de <i>V.inaequalis</i> non-traitées (DO = 0 mg.mL^{-1}) et traitées (DO = $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) après coloration au bleu de Méthylène à deux grossissements (100 et 400).	124
Figure 43 : Observation au Microscope Electronique à Balayage de spores de <i>V.inaequalis</i> non-traitées (DO = $0,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) et traitées (DO = $0,1$; $0,3$ et $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) à différents grossissements (A= 841, B= 4 600, C= 21 480) (Protocole Déshydratation Température ambiante).	125
Figure 44 : Observation au Microscope Electronique à Balayage de spores de <i>V.inaequalis</i> non-traitées (DO = $0,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) et traitées (DO = $0,1$; $0,3$ et $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) à différents grossissements (A= 841, B= 4 600, C= 21 480) (Protocole Point critique).	127
Figure 45 : Représentation de la paroi fongique, extraite de la publication de Bowman & Free (2006).	128
Figure 46 : Observation au Microscope Optique du développement de conidies de <i>V.inaequalis</i> à 0, 8, 24 (grossissement 100) et 48 heures (grossissement 40) après dépôt sur cellules de Malassez.	131
Figure 47 : Effet d'une application d'eau (échantillons T) ou d'eau chargée en ozone (échantillons Oz) sur les spores de <i>V.inaequalis</i> (traitement effectué 0, 8, 24 ou 48 heures après la mise en culture).	132
Figure 48 : (A) Développement schématique d'une spore de <i>V.inaequalis</i> sur feuille de cellophane entre 0 et 48 heures et (B) Observation au Microscope Optique du développement de spores de <i>V.inaequalis</i> à 0, 8, 24 (grossissement 100) et 48 heures (grossissement 40) après dépôt sur cellule de Malassez.	134
Figure 49 : Effet de deux applications d'eau (échantillons T) ou d'eau chargée en ozone (échantillons Oz) sur les spores de <i>V.inaequalis</i> en cours de développement.	135
Figure 50 : Taux d'inhibition du développement des spores de <i>V.inaequalis</i> en fonction du moment d'application et du nombre de traitements à l'eau chargée en ozone.	136
Figure 51 : Niveau d'infection par la tavelure des feuilles 1 et 2 ainsi que de l'ensemble des jeunes plants selon les différentes modalités (protocole A).	139
Figure 52 : (A) Modalité « Témoins » et (B) Modalité « Ozonés » (photographie prise trois semaines après inoculation)	140

Liste des illustrations

Figure 53 : Evolution théorique de l'eau sur la feuille selon les différentes modalités (Protocole A).	141
Figure 54 : Evolution théorique de l'eau sur la feuille selon le protocole A de base et le protocole B « Séchage ».	143
Figure 55 : Niveau d'infection par la tavelure des feuilles 1 et 2 ainsi que de l'ensemble des plantules selon les différentes modalités (protocole B « séchage »).	146
Figure 56 : Niveau d'infection par la tavelure des feuilles 1 et 2 ainsi que de l'ensemble des plantules selon les différentes modalités (protocole C « 2 traitements »).	149
Figure 57 : (A) Modalité « Témoins » et (B) Modalité « Ozonés » (photographie prise trois semaines après inoculation)	149
Figure 58 : Dose minimale permettant de réduire d'au moins 50 % le taux de germination en fonction de la surface cellulaire moyenne des spores de chacune des espèces fongiques	157
Figure 59 : Mécanisme d'action supposé de l'ozone sur les spores fongiques	162
Figure 60 : Taux de désorption de l'ozone en fonction de la distance parcourue et de la buse	165
Figure 61 : Taux de désorption de l'ozone en fonction de la pression et de la buse (buses ADX-120-02 et TEEJET).	166

Productions scientifiques

➤ Publications

PAGES M., KLEIBER D., PIERRON R.J.G., VIOLLEAU F., 2015. *Ozone Effects on Botrytis cinerea Conidia Using a Bubble Column: Germination Inactivation and Membrane Phospholipids Oxidation. Ozone: Science & Engineering (in press).*

PIERRON R.J.G., **PAGES M.**, COUDERC C., COMPANT S., JACQUES A., VIOLLEAU F., 2015. *In vitro and in planta fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungus Phaeoacremonium aleophilum.* Scientia Horticulturae, 189 (2015), 184-191.

➤ Communications orales

PAGES M., KLEIBER D., VIOLLEAU F., 2013. *Ozone Effects on Botrytis cinerea conidia.* 20th Ozone Word Congress, Las Vegas, Etats-Unis, Septembre 2013.

PIERRON R.J.G., **PAGES M.**, COUDERC C., COMPANT S., VIOLLEAU F., JACQUES A. *Protection of Vitis vinifera L. pruning wounds from Phaeoacremonium aleophilum using ozonated water: A solution for integrated esca-associated fungi management in grapevine nurseries?* 9th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, 2014, Adelaide, Australie, Volume: Phytopathologia Mediterranea 53(3):565-592.

PIERRON R.J.G., **PAGES M.**, GAUCHER-DELMAS M., KLEIBER D., VIOLLEAU F., JACQUES A. *Size separation of fungal spores and conidia using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation in steric/hyperlayer mode.* 16th International Symposium on Field- and Flow- Bases Separations, Pau, France, Juillet 2013.

PAGES M., KLEIBER D., VIOLLEAU F., 2015. *Ozone Effects on fungal material.* 21th Ozone Word Congress, Barcelone, Espagne, Juillet 2015.

TOURNOIS M., **PAGES M.**, ROUSTAN M., KLEIBER D., VIOLLEAU F., HEBRARD G. *Implementation of fungal treatment through Ozonated Water pulverization: Characterization of Ozone desorption.* 21th Ozone Word Congress, Barcelone, Espagne, Juillet 2015.

